Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

EIN BEITRAG ZUR CHEMIE UND ENZYMOLOGIE DER RIBOSOMEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Winfried Krone
aus
Sondershausen

Oktober 1962

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

EIN BEITRAG ZUR CHEMIE UND ENZYMOLOGIE DER RIBOSOMEN

R. UNIV. BIBLIOTHEK MÜNCHEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Winfried Krone
aus
Sondershausen

Oktober 1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1962

Erster Berichterstatter: Herr Prof. Dr. A. Butenandt,
Zweiter Berichterstatter: Herr Prof. Dr. F. Lynen.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt in der Zeit vom Januar 1960 bis zum April 1962 durchgeführt.

Herrn Professor Butenandt möchte ich dafür danken, daß er mir die Anfertigung dieser Arbeit im Max-Planck-Institut für Biochemie ermöglicht und ihren Fortgang in so großzügiger Weise gefördert hat.

Herrn Dr. W. Zillig danke ich besonders für das Verständnis, das er dem Anfänger entgegenbrachte, für seine stete Hilfsbereitschaft und für viele wertvolle Anregungen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen 5

Einleitung 7

Die Entdeckung der Ribosomen und ihrer Funktion 7

Eigenschaften der Ribosomen von Escherichia coli B. 13

A L L G E M E I N E R T E I L

A. Ribosomen-Proteine 19

I. Unterscheidung löslicher und unlöslicher Ribosomen-Proteine 19

II. Das ribosomale Strukturprotein 21

III. Die löslichen Ribosomen-Proteine 23

1. Die ribosomale Ribonuklease 24

a) Die Entdeckung des Enzyms 24

b) Anreicherung der ribosomalen Ribonuklease 25

c) Identifizierung der RNS-Spaltprodukte 28

d) Zur Wirkungsweise des Enzyms 32

e) Lokalisierung der ribosomalen Ribonuklease in den 30 S-Ribosomen 40

f) Aktivierung und Hemmung der ribosomalen Ribonuklease 43

g) Zur Stabilität des Enzyms 50

h) Immunologische Versuche 51

2. Die sogenannte ribosomale Phosphatase 54

B. Niedermolekulare Bestandteile der Ribosomen 56

I. Extraktion der Ribosomen mit einem Ameisensäure-Essigsäure-Puffer pH 1,9 56

II. Extraktion der Ribosomen mit Methanol 59

C. Diskussion 61

Zusammenfassung 69

Seite

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Gewinnung und Reinigung der Ribosomen aus Escherichia coli B. 71
2. Spaltung von Ribosomen 74
3. Extraktion der Ribosomen 76
4. Anreicherung der ribosomalen RNase 76
5. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität 82
6. Lokalisierung der ribosomalen Ribonuklease in den 30 S-Ribosomen 83
7. Immunologische Versuche 86
8. Identifizierung der RNS-Spaltprodukte, die bei der Einwirkung von ribosomaler Ribonuklease entstehen 88
9. Identifizierung der biogenen Amine 90
10. Allgemeine Methoden 90

Literaturverzeichnis 92

Verzeichnis der Abkürzungen

a. Nukleinsäure-Derivate, Nukleinsäuren und Enzyme.

A,	C,	G,	U,
Adenin	Cytosin	Guanin	Uracil

Ap, Cp, Gp, Up,
Mononukleotide des Adenins, Cytosins, Guanins und Uracils; Phosphat am 2'- oder am 3'-Hydroxyl der Ribose.

Ap! Cp! Gp! Up!
Cyclische Nukleosid-2'-3'-monophosphate von Adenosin, Cytidin, Guanosin und Uridin.

R	Ribose
$R_{5\text{-}P\text{-}3}R$	über eine Phosphorsäure-diesterbindung vom 5'-Hydroxyl der einen zum 3'-Hydroxyl der anderen verknüpfte Ribosen.
AR_5P	Adenylsäure
AR_5PPP	ATP, Adenosintriphosphorsäure
PP	Pyrophosphat
RNS	Ribonukleinsäure
l-RNS	lösliche Ribonukleinsäure
m-RNS	Messenger-RNS, Informationstransfer-RNS
RNP	Ribonukleoproteid-Partikel, Ribosom.
DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
DNase	Desoxyribonuklease

b. Sonstige Abkürzungen

AE-Puffer	Ameisensäure-Essigsäure-Puffer, pH 1.9
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure (englisch abgekürzt)
E	Extinktion
$E_{R'}$	Für die Aminosäure mit dem Rest R' spezifisches aktivierendes Enzym
m	molar
M	Molekulargewicht
Min	Minuten
UPM	Umdrehungen pro Minute

S Svedberg-Einheit für die Sedimentationskonstante, Dimension : 10^{-13} Sekunden

260/280-Verhältnis: Verhältnis der Extinktionen bei 260 mμ und 280 mμ.

EINLEITUNG

Die Entdeckung der Ribosomen und ihrer Funktion.

Die Entwicklung der Biochemie ist in den letzten zehn Jahren unter anderem durch eine äußerst fruchtbare Verschmelzung mit der Cytologie gekennzeichnet. In der "biochemischen Cytologie" fanden sich beide Disziplinen zur Lösung der gemeinsamen Aufgabe zusammen, die biochemischen Vorgänge in der Zellarchitektur zu lokalisieren und dadurch den inneren Aufbau der Zelle funktionell verstehen zu lernen. Eine der folgenreichsten Begegnungen von Biochemie und Cytologie vollzog sich bei der Erforschung der Funktion der Ribonukleinsäuren.

Die ersten Vorstellungen über die Rolle der RNS in der Zelle stammten von Caspersson (1) (Stockholm) und Brachet (2) (Brüssel). Diese Autoren fanden mit verschiedenen cytochemischen Methoden, daß alle Zellen, die in hohem Maße Proteine synthetisieren, einen hohen Gehalt an RNS aufweisen. Caspersson, der sich der Ultraviolett-Mikrospektrophotometrie bediente, ordnete seine Ergebnisse zu einer ersten Theorie der Proteinbiosynthese. Wenn seine Vorstellungen heute im einzelnen auch nicht mehr aufrechterhalten werden können, so bleibt doch eine fundamentale Aussage unbestritten: daß nämlich "für jede biologische Eiweißsynthese die Gegenwart von Nukleinsäuren notwendig" sei.

Der hohe RNS-Gehalt proteinsynthetisierender Zellen zeigt sich bei Säugetieren besonders im exokrinen Teil des Pankreas, an den pepsinsynthetisierenden Zellen der Magenschleimhaut, in Leberzellen, besonders des regenerierenden Gewebes nach partieller Hepatektomie bei der Ratte, in embryonalem Gewebe während der Differenzierung und an jungen Oozyten. Auch an rasch wachsenden Tumoren läßt sich ein hoher RNS-Gehalt pro Zelle nachweisen.

Ein eindrucksvolles Beispiel aus der Insektenwelt sind die sezernierenden Zellen der Spinndrüse des Seidenspinners Bombyx mori. Sie übertreffen in ihrem RNS-Gehalt die nicht sezernierenden Zellen der Drüse um mehr als das Zehnfache (3). Der RNS-Gehalt der Speicheldrüsenzellen von Drosophila-Larven wechselt mit der Sekretionsaktivität (4).

Bei Algen (5) und Mikroorganismen geht der RNS-Gehalt zeitlich der Wachstumsaktivität durchaus parallel. Eine direkte Proportionalität von Wachstumsgeschwindigkeit und RNS-Gehalt pro Zelle ist bei Bacterium lactis aerogenes (6) und bei dem Flagellaten Polytomella (7) nachgewiesen worden. Die Beispiele ließen sich beliebig vermehren.

Noch bevor tiefere Einblicke in den Zusammenhang von RNS-Gehalt und Proteinbiosynthese gewonnen wurden, gelang es Albert Claude um 1940 (8), die RNS einem bestimmten Zellbestandteil zuzuordnen. Claude fraktionierte den Zellinhalt durch differentielle hochtourige Zentrifugation von Gewebshomogenaten. Aus dem von Zellkernen, Zellwandtrümmern und Mitochondrien befreiten Überstand von Homogenaten verschiedener Säugetiergewebe ließ sich eine langsam sedimentierende Fraktion gewinnen, die aus Ribonukleoproteiden und Lipoproteiden bestand. Claude gab dieser Fraktion den Namen "Mikrosomen". Durch Zentrifugationsversuche an intakten Zellen konnte er ferner zeigen, daß die Mikrosomen keinem lichtmikroskopisch sichtbaren Zellbestandteil entsprechen, daß sie aber die Basophilie des Cytoplasmas bedingen, die Caspersson und Brachet zur Lokalisierung der Nukleinsäuren in der Zelle herangezogen hatten.

Die Struktur der Mikrosomen konnte erst durch das Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Die erfolgreiche Anwendung des Elektronenmikroskops auf Zelldünnschnitte führte in den Jahren nach 1950 zur Entdeckung vieler submikroskopischer Strukturen in der Zelle. Die Morphologie des Zellinneren konnte nun bis zu den Dimensionen der Makromoleküle vordringen.

Die elektronenmikroskopischen Bilder ließen in der Fülle submikroskopischer Strukturen des Cytoplasmas insofern eine gewisse Ordnung erkennen, als eine Reihe von Zellbestandteilen in fast allen untersuchten Zellen zu beobachten war. In besonders hohem Maße traf dies für elektronenoptisch dichte, ovale oder runde Partikeln von 80 bis 200 Å Durchmesser zu. Diese fand man teils frei im Cytoplasma verstreut, teils an die Membranen des endoplasmatischen Reticulums gebunden.

Letzteres ist ein in hochdifferenzierten Zellen besonders stark entwickeltes intracelluläres System (9) aus Membranen von etwa 80 Å Dicke, die in annähernd parallelem Verlauf ovale bis längliche Hohlräume umschließen.

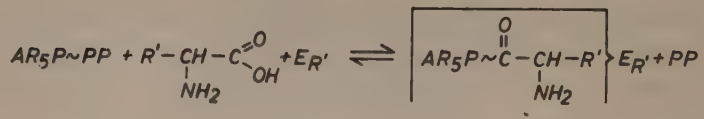
Im Jahre 1956 konnten Palade und Siekevitz (10) zum ersten Mal elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mikrosomen aus einem Rattenleberhomogenat herstellen. Auf diesen Bildern war ohne Schwierigkeit die nahe Verwandtschaft der Mikrosomen mit dem in Zellschnitten beobachteten endoplasmatischen Reticulum zu erkennen: sie zeigten kleinere Bruchstücke der Membranen, die - wie in der Zelle - z.T. dicht mit den oben erwähnten Partikeln besetzt waren. Es gelang den Autoren mit Hilfe von Natriumdesoxycholat die Lipoproteid-Membranen in Lösung zu bringen und die Partikeln durch Ultrazentrifugation zu isolieren (11). Die chemische Analyse ergab, daß in ihnen fast die gesamte RNS der Mikrosomen enthalten war, während sie sich als frei von Lipoproteiden erwiesen. Es handelte sich also um Ribonukleoproteid-Partikeln. Aus Bakterien waren bereits 1952 in Gestalt und Größe ähnliche Ribonukleoproteid-Präparate hergestellt worden (12). In der Folgezeit bürgerte sich der Name "Ribosomen" ein, der heute allgemein gebräuchlich ist.

Das große Interesse, das den Ribosomen in den letzten Jahren entgegengebracht wurde, beruht auf der Entdeckung ihrer Funktion bei der Protein-Biosynthese. Schon auf Grund der anfangs geschilderten Beobachtungen über den RNS-Gehalt proteinsynthetisierender Zellen mußte vermutet werden, daß man in den Ribosomen eine für die Proteinbiosynthese entscheidende Zellfraktion in der Hand hatte. Diese Vermutung wurde zur Gewißheit, als Einbauversuche mit radioaktiv-markierten Aminosäuren unabhängig davon, ob sie in vivo am Säugetier oder in zellfreien Systemen verschiedener Herkunft durchgeführt wurden, zu dem übereinstimmenden Ergebnis führten, daß die Aminosäuren in peptidartig gebundener Form zuerst in den Ribosomen auftreten (13). Die Membranen des endoplasmatischen Reticulums haben sich für die Verknüpfung der Aminosäuren zu Polypeptidketten als überflüssig erwiesen (14,15,16,17).

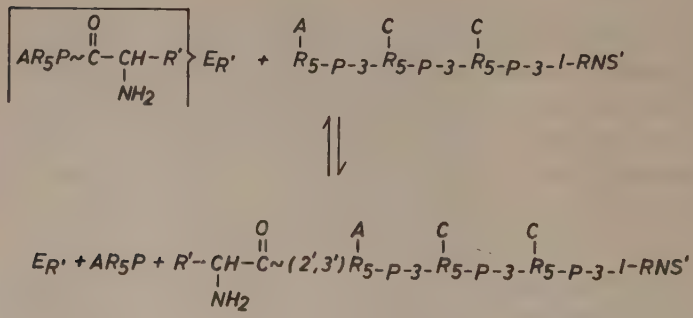
In den folgenden Formelbildern (I bis III) ist unser heutiges Bild vom Mechanismus der Proteinbiosynthese zusammengefaßt. Dem von den Ribosomen vermittelten Aufbau der Polypeptidketten gehen zwei Reaktionsschritte voraus.

Spezifische aminosäureaktivierende Enzyme ($E_{R'}$) verknüpfen die Aminosäuren mit dem Adenylsäurerest aus ATP unter Pyrophosphat-Abspaltung zu energiereichen gemischten Anhydriden, den Aminoacyladenylaten (I) (18). Im zweiten Reaktionsschritt werden die Aminoacylreste - ebenfalls unter der katalytischen Wirkung der aminosäureaktivierenden Enzyme - von der Anhydridbindung auf die Esterbindung an die endständigen Adenosingruppen spezifischer löslicher Ribonukleinsäuren übertragen (II) (19).

I



II



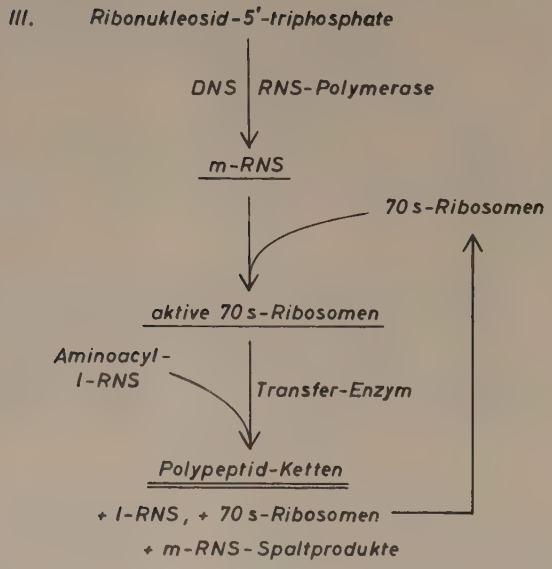
Im Sinne der Adaptorhypothese von Hoagland (20) wird durch diesen Reaktionsschritt eine wesentliche Voraussetzung für die Prägung spezifischer Aminosäuresequenzen durch eine Nukleinsäure-Matrize geschaffen: Die Bildung der Wasserstoffbrücken zwischen Sequenzbereichen der Matrize und dazu komple-

mentären Stücken der Aminoacyl-l-RNS-Moleküle kann nunmehr über den Platz entscheiden, an dem eine bestimmte Aminosäure in die Polypeptidkette eingebaut werden soll. Die zweite Voraussetzung ist eine für die Anlagerung der l-RNS-Moleküle geeignete räumliche Verankerung der Matrize in der Zellstruktur. Als Matrize muß heute die sogen. "Messenger"-RNS oder Informationstransfer-RNS betrachtet werden (21). Diese in den meisten Systemen außerordentlich instabile kleine Fraktion hochmolekularer RNS erfüllt als einzige die Bedingung, an die die Funktion der Informationsübertragung von der DNS zur Proteinbiosynthese geknüpft ist: Sie entspricht in ihrer Basenzusammensetzung und Sequenz der DNS (wenn man jeweils Uridylsäure an die Stelle der Thymidylsäure setzt) und ihre Biosynthese aus Ribonukleosid-Triphosphaten vollzieht sich nur in Gegenwart von DNS (22,23,24,25). Die räumliche Verankerung der Matrize schließlich erfolgt an den Ribosomen. Radioaktiv-markierte Messenger-RNS findet man in Proteinbiosynthese-Systemen an die 70 S-Ribosomen (s.S.14 und 15) gebunden (26).

Die Übertragung der Aminoacylreste in Polypeptidketten an der Matrize vollzieht sich unter dem Einfluß eines SH-Enzyms, des sogen. "Transfer"-Enzyms (27). In Säugetiersystemen ist dazu ferner Guanosintriphosphat erforderlich. Es ist bemerkenswert, daß das Wachstum der Polypeptidketten am Aminoende beginnt und zum Carboxylende hin fortschreitet (28,29,30) (III).

Angesichts der wichtigen Funktion, die die Ribosomen bei der Biosynthese der Proteine ausüben, ist die Erforschung ihrer Struktur in den letzten Jahren von vielen Arbeitsgruppen vorangetrieben worden. Die Frage nach dem Zusammenhang von Struktur und Funktion stellt sich hier auf eine völlig neue Weise. Bei den Enzymen kann die katalytische Wirksamkeit meistens einem relativ engumgrenzten Bereich des gesamten Moleküls zugeordnet werden: dem aktiven Zentrum. Für die Anlagerung hochmolekularer Messenger-RNS an die Ribosomen und die Verknüpfung der Aminosäuren zu Polypeptid-

ketten an der Oberfläche dieses Komplexes muß dagegen das Ribosom als Ganzes beansprucht werden. Die Ergebnisse, die in dem folgenden kurzen Überblick über die Eigenschaften der Ribosomen zusammengefaßt sind, haben manchen Autoren bereits Anlaß zu anschaulichen Vorstellungen darüber gegeben.



Eigenschaften der Ribosomen aus Escherichia coli B.

Die Ribosomen aus Säugetiergeweben, Tumorzellen, Erbsenkeimlingen, Hefe und Bakterien zeigen im wesentlichen den gleichen chemischen Aufbau und die gleichen Partikelgrößen. Eine allgemeine Charakteristik kann deshalb an Hand der E.coli-Ribosomen gegeben werden.

Der Ribosomengehalt der Bakterienzellen hängt von der Wachstumsphase ab. Die höchste Ribosomenkonzentration findet man während des logarithmischen Wachstums (31). Aus Bakterienextrakten, die durch niedertourige Zentrifugation von grobpartikulären Bestandteilen befreit wurden, kann man die Ribosomen durch mehrstündige Zentrifugation bei 100 000 g gewinnen. Von anhaftenden Bestandteilen des Zellsaftes befreit man sie weitgehend durch mehrere Waschzentrifugationen. Die Reindarstellung verschiedener Ribosomensorten gelingt annähernd durch differentielle Ultrazentrifugation, wobei jedoch nur die jeweils leichtere Komponente rein erhalten wird. Die vollständige Trennung verschiedener Ribosomensorten voneinander ermöglicht die Zentrifugation über Saccharose-Konzentrationsgradienten (32).

Art und Anzahl der Ribosomensorten, die in Extrakten aus E.coli enthalten sind, hängen von der Magnesiumkonzentration im Extraktionsmedium ab (33, 34). In 0,035 m Phosphatpuffer vom pH 7,0 erhält man bei einer Magnesiumkonzentration von 0,004 m zwei Komponenten mit den Sedimentationskonstanten 30 S und 50 S (Abb. 1).

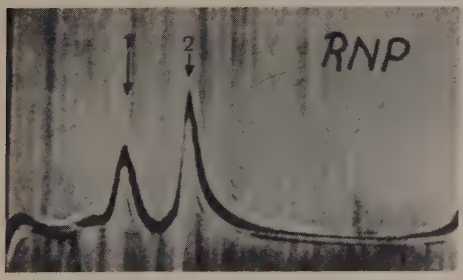


Abb. 1. Sedimentationsbild der 30 S- und 50 S-Ribosomen aus E.coli, in 0,035 m Phosphatpuffer pH 7,0, 0,004 m Magnesiumacetat (Meniskus links).

Bei höheren Magnesiumkonzentrationen treten schwerere Ribosomen mit Sedimentationskonstanten von 70 S und 100 S auf, während die 30 S- und 50 S-Partikeln verschwinden. Die quantitative Untersuchung dieses Vorganges zeigt, daß es sich um einen reversiblen Aggregationsvorgang handelt, der durch folgende Gleichung beschrieben werden kann (33):

$$2\ (30\ S) + 2\ (50\ S) \rightleftharpoons 2\ (70\ S) \rightleftharpoons (100\ S)$$

Nach Watson und Tissières liegen die Stabilitätsbereiche der verschiedenen Ribosomensorten in 0,01 m Tris-Puffer, pH 7,4, bei folgenden Magnesiumkonzentrationen:

30 S + 50 S:	0,0001 m bis 0,0002 m
70 S:	0,0005 m bis 0,001 m
100 S:	0,005 m bis 0,01 m

Die Molekulargewichte der verschiedenen Partikelsorten sind angenähert ganzzahlige Vielfache von $0{,}9.10^6$, nämlich:

30 S:	$0{,}9 \cdot 10^6$
50 S:	$1{,}8 \cdot 10^6$
70 S:	$2{,}7 \cdot 10^6$
100 S:	$5{,}4 \cdot 10^6$

Elektronenmikroskopische Bilder der Ribosomen von E.coli bestätigen die mit der analytischen Ultrazentrifuge erhaltenen Befunde über die reversiblen Aggregationen leichterer Ribosomen zu schwereren (35). Abbildung 2 zeigt eine nach der Methode von Huxley und Zubay gewonnene Aufnahme, auf der zu erkennen ist, daß die 70 S-Ribosomen aus zwei ungleichen Partikeln aufgebaut sind, während die 100 S-Partikeln aus zwei 70 S-Ribosomen bestehen. Schematisch läßt sich dieser Sachverhalt folgendermaßen darstellen:

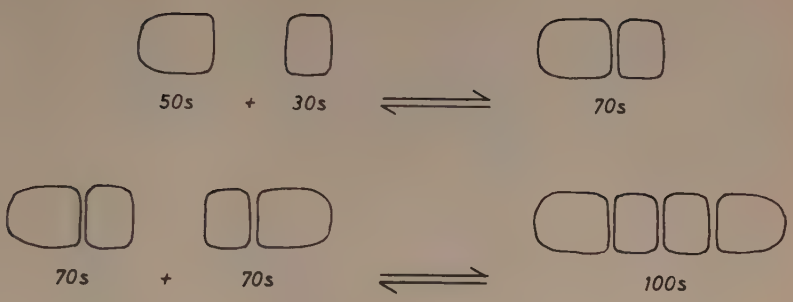


Abb. 2. Elektronenmikroskopisches Bild der 70 S- und 100 S-Ribosomen aus E.coli. Elektronenoptische Vergrößerung 40 000fach; Gesamtvergrößerung: 400000fach.
Herr Dr.Dr. P.H.Hofschneider stellte die nach der Methode von Huxley und Zubay (35) mit dem Siemens-Elmiskop gewonnene Aufnahme freundlicherweise zur Verfügung.

Das UV-Spektrum der Ribosomen zeigt wie das der RNS ein ausgeprägtes Maximum bei 260 mμ (Abb. 3). Das 260/280-Verhältnis reinster Ribosomen liegt zwischen 1,98 und 2,0.

Die vier Ribosomensorten scheinen sich in ihrer chemischen Zusammensetzung nur unwesentlich zu unterscheiden. Die Angaben verschiedener Autoren über den RNS-Gehalt der Ribosomen schwanken, wohl infolge von Bestimmungen an Ribosomen unterschiedlichen Reinheitsgrades, zwischen 55 % und 63 %. Der Rest besteht vorwiegend aus Proteinen; daneben findet sich ein kleiner Prozentsatz niedermolekularer Bestandteile (s.S. 56).

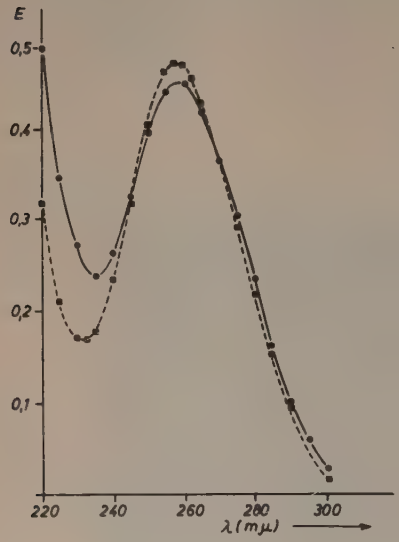


Abb. 3.
UV-Spektren der Ribosomen aus E.coli (ausgezogene Kurve) und der nach der Phenol-Methode (36) gewonnenen ribosomalen RNS.

Über das Molekulargewicht der ribosomalen RNS bestanden lange Zeit stark voneinander abweichende Vorstellungen. Obwohl schon frühzeitig zwei RNS-Komponenten mit den Sedimentationskonstanten 15 S und 20 S nachgewiesen worden waren (17,40), setzte sich in vielen Arbeitsgruppen die Auffassung durch, die ribosomale RNS sei aus Untereinheiten mit Sedimentationskonstanten um 8 S und einem etwaigen Molekulargewicht von 100 000 aufgebaut. Die angeblichen Untereinheiten, die auch im Verlauf der eigenen Untersuchungen beobachtet wurden (34), entstanden aus den Präparationen hochmolekularer ribosomaler RNS durch Einflüsse, durch die auch die in

den Ribosomen enthaltene Nuklease (s.S.24) aktiviert wird, nämlich: Erwärmen auf 37° C, Magnesiumentzug durch EDTA, hohe Harnstoffkonzentrationen. Die Schwierigkeit, intakte ribosomale RNS zu gewinnen und solchen Einflüssen gegenüber stabil zu erhalten, wurden von Kurland (37) folgerichtig darauf zurückgeführt, daß die ribosomale RNase nur schwer vollständig inaktiviert und von der RNS entfernt werden kann. Wird das Enzym schon während der RNS-Gewinnung nach der Phenol-Methode (36) durch Natriumdodecylsulfat, Polyvinylsulfat (38) oder Frankonit gehemmt, so gelingt es, hochmolekulare ribosomale RNS zu erhalten, sofern man die übliche Fällung mit Äthanol durch Kochsalz-Fällung ersetzt (39). Auf diese Weise erhält man aus 100 S-, 70 S- und aus dem Gemisch der 30 S- und 50 S-Ribosomen zwei RNS-Komponenten mit den Sedimentationskonstanten 16 S und 23 S und Molekulargewichten von $5{,}6 \cdot 10^5$ und $1{,}1 \cdot 10^6$ (Abb. 4).

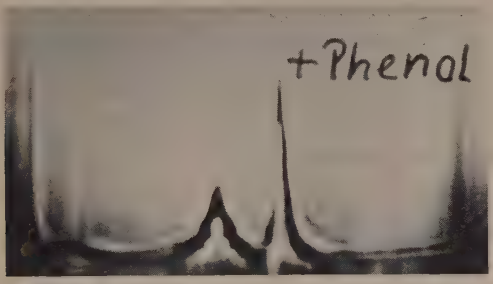


Abb. 4. Sedimentationsbild der aus dem Gemisch der 30 S- und 50 S-Ribosomen gewonnenen Phenol-RNS.

Die 16 S-Komponente besteht aus kovalent gebundenen Polynukleotidketten des angegebenen Molekulargewichts. Demgegenüber scheint die 23 S-Komponente aus zwei nicht kovalent gebundenen 16 S-Einheiten aufgebaut zu sein. Durch Spaltung der Ribosomen mit EDTA in der Kälte erhält man zwei hochmolekulare RNS-Komponenten mit höheren Sedimentationskonstanten: 17 S und 25 S. Offensichtlich bleibt ein Teil der Ribosomen-Proteine bei dieser Behandlung an die RNS gebunden.

Die abgespaltenen löslichen Ribosomen-Proteine zeichnen sich im Sedimentationsbild als ein langsam sedimentierendes sehr heterogenes Gemisch ab (Abb. 5).

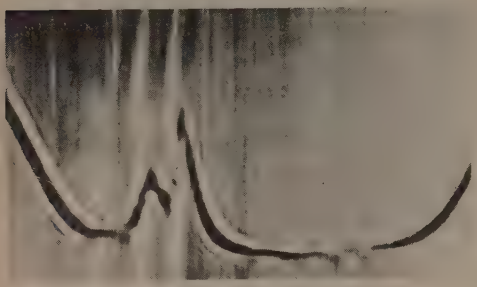


Abb. 5.
Sedimentationsbild des EDTA-Spaltproduktes aus 30 S- + 50 S-Ribosomen. Die beiden scharfen Gipfel entsprechen der 17 S- und der 25 S-Komponente, während der Schrägabfall am Meniskus (links) das Gemisch der abgespaltenen Ribosomen-Proteine darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in den Ribosomen enthaltenen Proteine näher untersucht. Das stärkste Interesse galt der Ribonuklease, die zur Fraktion der löslichen Ribosomen-Proteine gehört.

Ferner wurde eine Reihe niedermolekularer Substanzen in den Ribosomen nachgewiesen.

ALLGEMEINER TEIL

A. Ribosomen-Proteine

I. Unterscheidung löslicher und unlöslicher Ribosomen-Proteine

In allen bisher untersuchten Ribosomenarten finden sich zwei Klassen von Proteinen. Sie unterscheiden sich durch ihr Löslichkeitsverhalten in wässrigen Puffern mittleren pH-Bereiches. Der größte, in diesen Lösungsmitteln unlösliche Anteil fällt bei der Spaltung der Ribosomen in RNS und Protein aus und kann durch Zentrifugation von dem kleineren Anteil löslicher Proteine abgetrennt werden.

Bei pH 7,3 sind in 0,01 m Tris-Succinat-Puffer 80 % der Ribosomen-Proteine unlöslich, während 16 % in Lösung gehen. Das Mengenverhältnis der löslichen und unlöslichen Anteile ist in hohem Maße vom pH-Wert und von der Ionenstärke abhängig.

Etwa die Hälfte der in 1%iger Kochsalzlösung löslichen Ribosomen-Proteine fällt bei der Dialyse gegen Wasser aus. Die in Wasser lösliche Fraktion unterscheidet sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung wesentlich von den in neutralen wässrigen Medien unlöslichen Ribosomen-Proteinen (Tab. 1).

Wie man sieht, ist die wasserlösliche Fraktion trotz ihres geringeren Gehaltes an Lysin und Arginin stärker basisch, da Glutaminsäure und Asparaginsäure vollständig amidiert sind. Ihr Gehalt an schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren ist geringer als der der schwerlöslichen Fraktion. Auffällig ist ferner der hohe Alaningehalt der wasserlöslichen Proteinfraktion.

Tab. 1: Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzungen a: der wasserlöslichen und b: der in neutralen wässrigen Puffern unlöslichen Ribosomen-Proteine. +)
Summe der im Säurehydrolysat enthaltenen Aminosäuren = 100 %.

Aminosäure	Molprozent in a	Molprozent in b
Lys	8,62	7,13
His	0,93	1,88
Arg	4,38	7,86
Asp	8,38	9,20
Glu	12,50	10,90
Cys-SO_3H	0,04	0,63
Met	1,69	2,12
Thre	4,65	5,10
Ser	4,78	4,42
Pro	3,16	3,50
Gly	8,16	8,00
Ala	17,70	10,10
Val	10,51	8,48
Ileu	4,65	5,58
Leu	7,24	8,10
Tyr	0,90	2,36
Phe	1,72	3,64
Mole Ammoniak pro 100 Mol Aminosäuren:		
	20,8	9,9

Als terminus technicus wurde für die Fraktion der schwerlöslichen Ribosomen-Proteine die Bezeichnung "ribosomales Strukturprotein" gewählt. Die so verdeutlichte Abgrenzung gegen die löslichen Ribosomen-Proteine erschien berechtigt, weil der Einbau radioaktiv-markierter Aminosäuren hauptsächlich in die lösliche Proteinfraktion erfolgt und weil die in den Ribosomen nachgewiesenen Enzyme nur in dieser Fraktion vorkommen.

+) Herr Dr. G. Braunitzer und Fräulein K. Haselhorst führten diese Analysen freundlicherweise mit dem Amino-Acid-Analyser der Firma Beckman durch.

Es soll jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch einem Teil der löslichen Ribosomen-Proteine die Funktion von Strukturproteinen zukommt, zumal die Ribosomen-Enzyme und die in Synthese begriffenen Proteine nur einen kleinen Teil der löslichen Fraktion ausmachen.

II. Das ribosomale Strukturprotein.

Ein Überblick über die Literatur zum ribosomalen Strukturprotein zeigt eine auffällige Übereinstimmung der Ergebnisse bei großer Verschiedenheit der Organismen, aus denen die Ribosomen jeweils isoliert wurden.

96 % des Proteins aus Hefe-Ribosomen sind in neutralen Puffern unlöslich und zeichnen sich durch einen geringen Schwefelgehalt aus (41). Bei der Spaltung der Ribonukleoproteide aus Lymphknoten und Milz von Kaninchen mit Ribonuklease fällt der größte Teil des Proteins aus (42). 85 bis 90 % der Proteine aus den Ribosomen von Erbsenkeimlingen sind in wässrigen Puffern zwischen pH 4 und pH 11, in Säuren und selbst in Harnstoff-Lösungen unlöslich. Erst oberhalb pH 12 oder bei hoher Guanidiniumchlorid-Konzentration können Lösungen dieser Proteine hergestellt werden (43).

Auch das Protein aus den Ribosomen von Azotobakter vinelandii ist in neutralen Puffern unlöslich, während es bei der Extraktion mit 67%iger Essigsäure in Lösung geht (44).

Der größte Teil der Proteine aus Rattenleber-Ribosomen kann nur nach langdauernder Dialyse gegen Puffer vom pH 10,5 in verdünnter Lösung erhalten werden (45).

Das Strukturprotein aus E.coli-Ribosomen fällt bei der Spaltung der Partikeln mit Harnstoff und EDTA, oder mit Phenol aus. In 1%iger Kochsalz-Lösung erweist es sich als besonders schwerlöslich. Anhaftendes lösliches Protein, Nukleotide und andere Verunreinigungen werden deshalb durch oftmaliges Waschen mit großen Volumina Kochsalz-Lösung entfernt. Die beim Phenolisieren der Ribosomen anfallende Präparation ("Z-Protein") unterscheidet sich im Löslichkeits-

verhalten und in der Aminosäure-Zusammensetzung nicht von dem mit Harnstoff und EDTA gewonnenen Strukturprotein ("S-Protein").

Zwischen pH 3,2 und pH 9,0 ist es unlöslich in wässrigen Puffern. Auch mit Eisessig kann man es nicht in Lösung bringen. Dagegen erhält man mit hohen Harnstoff-Konzentrationen, mit 2 m Guanidiniumchlorid sowie mit 80 bis 100%iger Ameisensäure Lösungen des Strukturproteins, aus denen es jedoch beim Verdünnen mit Wasser oder mit neutralem Phosphatpuffer wieder ausfällt. Auch bei der Dialyse seiner Lösungen in 6 bis 10 m Harnstoff oder in 2 m Guanidiniumchlorid gegen neutrale Puffer bleibt das Protein nicht gelöst. Teilweise wird es auch bei der Dialyse dieser Lösungen gegen Boratpuffer pH 9,0 gefällt. Erst ein pH-Wert von 10,0 im Außenmedium vermag das Protein vollständig in Lösung zu halten. Auf der sauren Seite des Fällungsbereiches erhält man sehr verdünnte Lösungen des S-Proteins durch Dialyse gegen 0,05 m Acetat-Puffer pH 3,2. Der Versuch, die Acidität mit Natriumacetat abzustumpfen, führt zur Ausfällung des Proteins.

Diese Löslichkeitseigenschaften zeigen, daß das ribosomale Strukturprotein stark zur Aggregation neigt. Das drückt sich auch in seinem Sedimentationsverhalten aus. Die Sedimentationskonstante nimmt mit steigender Konzentration zu [+)]; eine Eigenschaft, die von anderen aggregierenden Proteinen her bekannt ist (z.B. vom Insulin, (46)). Die bisher gemessenen Werte liegen zwischen 1,8 S und 3,2 S. Das minimale Molekulargewicht berechnet sich aus Sedimentation und Diffusion zu etwa 6000.

Das 260/280-Verhältnis der auf den verschiedenen Wegen gewonnenen Proteine ist sehr hoch. Man findet für Z-Protein bei pH 3,2 und pH 10 : 1,32; für S-Protein bei pH 10 und in 8 m Harnstoff: 1,5 bis 1,6. Die an reinen Proteinen gemessenen Werte dieses Verhältnisses liegen zwischen 0,8 und 0,7. Durch Umfällen des S-Proteins aus 8 m Harnstoff kann

[+)] Bei monodispersen Systemen nimmt der Reibungskoeffizient mit steigender Konzentration zu, so daß die Sedimentationskonstante bei unendlicher Verdünnung ihren höchsten Wert erreicht.

der stark absorbierende Bestandteil nicht entfernt werden. Das UV-Spektrum des umgefällten S-Proteins zeigt ein ausgeprägtes Maximum bei 260 mμ. Nimmt man die Umfällung nicht durch Verdünnen mit Wasser, sondern durch Verdünnen mit dem vierfachen Volumen gesättigter Ammonsulfat-Lösung vor, so sinkt das 260/280-Verhältnis auf 1,3 bis 1,4. Vermutlich läßt sich mit einem geeigneteren Elektrolyten und durch mehrmalige Wiederholung der Umfällung der stark absorbierende Bestandteil vollständig entfernen.

III. Die löslichen Ribosomen-Proteine.

Der Anteil radioaktiv markierter Proteine, der sich bei Einbauversuchen mit ^{14}C-Aminosäuren nicht von den Ribosomen ablöst, sondern an die Partikeln gebunden bleibt, gehört zum größten Teil zur Fraktion der löslichen Ribosomen-Proteine (47). Diese erweist sich in der freien Elektrophorese und in der Ultrazentrifuge als heterogen (Abb. 5) und läßt sich mit Ammoniumsulfat in mehrere Fraktionen unterteilen. Bei der Chromatographie an Cellulose-Austauschern ergibt sich ein mit den Chromatogrammen von Überstandsproteinen vergleichbares Bild (48). Vermutlich ist ein Teil der löslichen Ribosomen-Proteine stets fest an die Ribosomen gebunden und gehört somit nicht zu den in Synthese befindlichen Proteinen. Erst durch eine weitgehende chromatographische Trennung und Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten in den einzelnen Fraktionen ließe sich entscheiden, welche löslichen Ribosomen-Proteine wie das Strukturprotein zu den integrierenden Bestandteilen der Ribosomen gerechnet werden müssen.

Zu den löslichen Ribosomenproteinen gehören auch die Enzyme, die als Bestandteile der Ribosomen nachgewiesen wurden.

1. Die ribosomale Ribonuklease.

a) Die Entdeckung des Enzyms.

Vor zwölf Jahren isolierte N.W.Pirie (49) ein Nukleoproteid aus Tabakblättern, das bei längerem Aufbewahren in der Kälte oder beim Inkubieren in Lösungen hoher Ionenstärke in denaturiertes Protein und säurelösliche Nukleotide und Nukleoside zerfiel. Pirie führte die Instabilität dieser Nukleoproteide auf Nukleasen und Phosphatasen zurück, die seine Präparationen in wechselnder Menge begleiteten.

1957 beobachtete David Elson die Zersetzung der RNS aus Ribonukleoproteiden von Escherichia coli bei der Einwirkung hoher Konzentrationen von Harnstoff. Der Vorgang zeigte alle Charakteristika eines enzymatischen Abbaues; auch zugesetzte Fremd-RNS wurde gespalten (50). Elson konnte zeigen, daß es sich nicht um eine unspezifische Phosphodiesterase oder um Polynukleotid-Phosphorylase handelt. Von einer ribosomalen RNase zu sprechen erschien jedoch erst nach weiteren Untersuchungen von Elson berechtigt (51,52), deren Ergebnisse hier kurz zusammengefaßt seien:

1. Das Enzym wird bei der Befreiung der Ribosomen von begleitenden Proteinen in demselben Maße angereichert wie die Ribosomen selbst. Die auf die ribosomale RNS bezogene spezifische Aktivität nimmt auch nach Anwendung drastischer Reinigungsmethoden (Fällung mit Ammoniumsulfat bzw. mit Bariumacetat in Gegenwart von Natriumdesoxycholat) nicht ab.
2. Das Enzym entfaltet seine Wirksamkeit erst nach Zerstörung oder Labilisierung der Ribosomenstruktur. Ohne derartige äußere Einwirkungen findet kein Zerfall der ribosomalen RNS statt und zugesetzte Fremd-RNS bleibt stabil.
3. Wasserstoffbrückensprenger wie Harnstoff und Guanidinium-Chlorid, hohe Salzkonzentrationen, Entzug des Magnesiums durch EDTA, sowie Behandlung der Ribosomen mit Trypsin führen zur Aktivierung der RNase. Der daraufhin einsetzen-

den Spaltung der ribosomalen RNS geht jeweils ein mehr oder minder weitgehender Zerfall der Ribosomen in Bruchstücke kleineren Molekulargewichtes voraus.

Die eigenen Untersuchungen galten vor allem der Wirkungsweise des Enzyms sowie seiner Anreicherung und näheren Charakterisierung.

b) Anreicherung der ribosomalen Ribonuklease.

Die bei der Zersetzung gereinigter Ribosomen mit EDTA und Harnstoff anfallenden Präparationen der löslichen Ribosomen-Proteine haben hohe Ribonuklease-Aktivität. Durch Dialyse werden sie von dem größten Teil der RNS-Spaltprodukte und von den Spaltungsreagenzien - EDTA und Harnstoff - befreit. Auf Grund der Unlöslichkeit des ribosomalen Strukturproteins findet bei der Gewinnung der löslichen Ribosomen-Proteine zugleich eine erste Anreicherung der ribosomalen RNase statt. Diese Anreicherungsstufe wird in der vorliegenden Arbeit mit E 1 bezeichnet. Das 260/280-Verhältnis von E 1 nach der Dialyse gegen neutrale Puffer oder gegen 1%ige Kochsalzlösung ist 1,32. Es kann durch Verwendung größerer Mengen Dialyse-Außenmediums und durch verlängerte Dialysezeiten nicht mehr vermindert werden. Erst im Verlaufe der Ammoniumsulfatfraktionierung werden die adsorbierten restlichen RNS-Spaltprodukte vom Protein getrennt.

Auf Elektropherogrammen von E 1 bei pH 7,3 sind sowohl in anodischer als auch in kathodischer Richtung Banden mit UV-Extinktion zu erkennen, während das durch Anfärbung lokalisierbare Protein unter diesen Bedingungen nicht wandert. Beim Phenolisieren von E 1 bleiben die Rest-Nukleotide in der wässrigen Phase. Das aus der Phenolphase zurückisolierte Protein hat ein 260/280-Verhältnis von 0,83.

Die Fällbarkeit des Enzyms mit Ammoniumsulfat ist in hohem Maße von der Proteinkonzentration abhängig. Aus einem zehnfach konzentrierten E 1 (15-30 mg Protein/ml) fallen bei 67%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat fast 70 % der

eingesetzten RNase-Aktivität aus. Bei der gleichen Ammoniumsulfat-Konzentration erhält man aus einer verdünnten E 1-Lösung (etwa 1 mg Protein/ml) ein Sediment, in dem sich keine RNase mehr nachweisen läßt. Bei mittlerer Proteinkonzentration (2-3 mg/ml) beginnt das Enzym oberhalb 60%iger Ammoniumsulfat-Sättigung auszufallen. Unter diesen Bedingungen wird die Anreicherung des Enzyms vorgenommen. Die zwischen 60 % und 80 % Sättigung ausfallende Proteinfraktion E 2 enthält mehr als 80 % der eingesetzten RNase-Aktivität. Die Anreicherung des Enzyms geht aus Tabelle 2 hervor.

Tab. 2

Anreicherung der ribosomalen RNase durch Ammoniumsulfat-Fällung. Ausgangsmaterial: 550 mg Ribosomen.

Stufe	Einheiten+)	Protein Menge (mg)	Spezif. Aktivität (Einheit/mg)	Ausbeute %	Anreicherung	260/280-Verhältnis
Zers. Ribosomen	2244	252,5	4,4	--	--	1,98-2,0
E 1	2154	40,5	26,6	96	5,8	1,32
E 2	1862	2,31	805	83	150	0,75

+) Als Aktivitätseinheit wurde die Zunahme der Extinktion bei 260 mμ um 0,1 in einer Minute unter den auf Seite 76 angegebenen Bedingungen gewählt.

Gegenüber E 1 ist das Enzym in E 2 30fach angereichert. Die Zahlenwerte der letzten Spalte zeigen, daß die durch Dialyse nicht abtrennbaren Nukleotide bei der Ammoniumsulfat-Fällung im Überstand bleiben. Auch die Sedimente, die sich bei geringeren Ammoniumsulfatkonzentrationen bilden, haben 260/280-Verhältnisse zwischen 0,7 und 0,8.

Der größte Teil der Nukleotide aus E 1-Präparationen konnte auch durch Chromatographie an Cellulose-Ionenaustauschern entfernt werden. Hiermit war jedoch weder bei Verwendung von Diäthylamino-äthyl-cellulose, noch von Carboxymethylcellulose

eine wesentliche Anreicherung des Enzyms verbunden. Ein hoher Prozentsatz der aufgetragenen RNase-Aktivität fand sich jeweils in einem Protein-Gipfel, der 30 % bis 55 % des eingesetzten Proteins enthielt.

Tabelle 3 zeigt das Ergebnis der Chromatographie einer nicht dialysierten E 1-Präparation an DEAE-Cellulose bei pH 7,2 (siehe auch Abb. 6, S. 28).

Tab. 3

	Protein mg	%	Aktivität Einh.	%	Spez.Aktiv. (Einh./mg)	Anreicherung	260/280
Aufgetragen	6,0	100	192	100	32	--	2,34
Gipfel 1	3,2	53	180	94	56	1,65	0,76

Bei der Chromatographie an Carboxymethylcellulose bei pH 7,0 wurden die Proteine stärker verzögert als die Nukleotide. Die ribosomale RNase wurde auch hier von der Hauptmenge des aufgetragenen Proteins begleitet. Mit Hilfe von Salz- und von pH-Gradienten konnten die Ergebnisse nicht verbessert werden. Weitere Versuche zur chromatographischen Reinigung des Enzyms sollten mit Amberlite IRC 50 durchgeführt werden. Als diese Versuche begonnen wurden, erschien die Arbeit von P.F. Spahr und B.R. Hollingworth (53) über ribosomale RNase, in der eine ausgezeichnete Methode zur chromatographischen Reinigung des Enzyms an IRC 50 beschrieben wird. Das Schwergewicht der eigenen Arbeiten wurde deshalb auf die Untersuchung der Wirkungsweise des Enzyms, insbesondere auf die Identifizierung der RNS-Spaltprodukte verlegt.

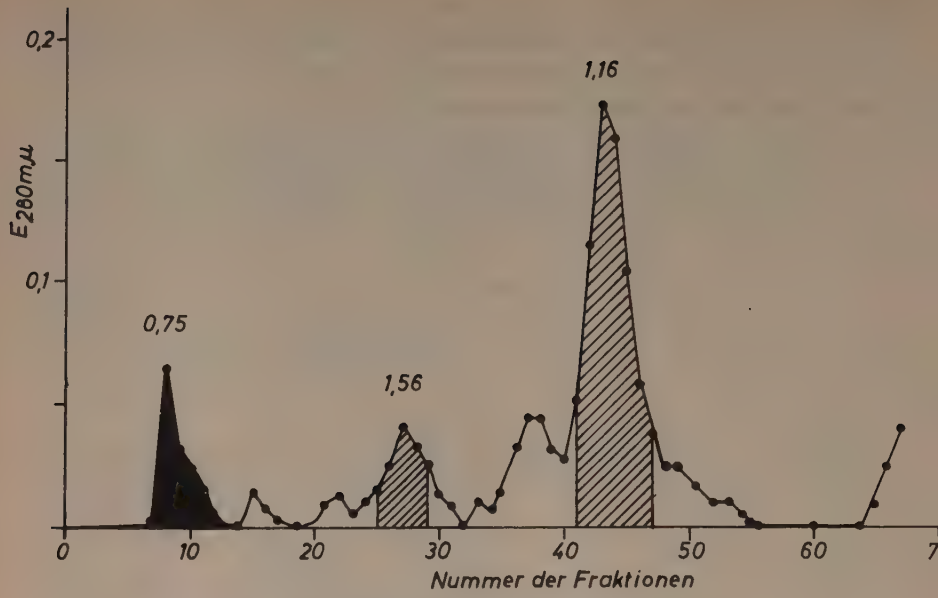


Abb. 6. Chromatographie einer nicht dialysierten Präparation der löslichen Ribosomenproteine auf DEAE-Cellulose.
Die gekennzeichneten Gipfel wurden auf RNase-Aktivität geprüft. Die Zahlen über diesen Gipfeln geben das 260/280-Verhältnis der jeweiligen Gipfelfraktion an.
Im ersten Gipfel befinden sich 94 % der eingesetzten RNase-Aktivität.

c) Identifizierung der RNS-Spaltprodukte.

Unterwirft man ein vom S-Protein befreites Zersetzungsgemisch der Ribosomen der Papierelektrophorese bei pH 3,2, so ergibt sich das in Abb. 7 dargestellte Bild.

Auf den Pherogrammen sind deutlich zwei Gruppen von UV-positiven Banden zu unterscheiden. Vier sehr intensive Banden entsprechen in ihren Wanderungsgeschwindigkeiten etwa den vier Mononukleotiden; sie wandern - abgesehen von der der Adenylsäure entsprechenden Bande - jeweils um einen geringen Betrag schneller als die reinen Mononukleotide.

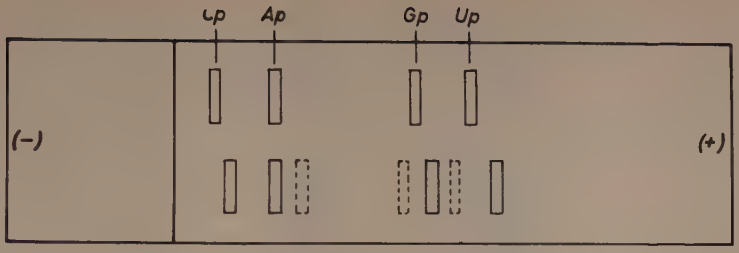


Abb. 7. Schematisches Elektropherogramm des Ribosomen-Zersetzungsproduktes in 0,05 m Ammoniumformiat pH 3,2.
Obere Reihe: Reine Mononukleotide als Vergleichssubstanzen.

Die naheliegende Vermutung, daß es sich bei diesen Spaltprodukten um Derivate der elektrophoretisch verwandten Mononukleotide handelt, findet in den UV-Spektren der Eluate dieser Banden ihre Bestätigung.

Neben diesen Hauptspaltprodukten sind auf den Pherogrammen drei schwächere Banden zu erkennen, die man nach ihren Wanderungsgeschwindigkeiten relativ zu den Banden der ersten Gruppe als "Prä-A", "Prä-G" und "Post-G" einordnen kann.

Das elektrophoretische Verhalten der vier Hauptspaltprodukte entspricht dem der cyclischen 2',3'-Nukleosid-Monophosphate (54). Es wurde daher nach weiteren Kriterien für die Identität der vier Substanzen mit Cp!, Ap!, Gp! und Up! gesucht.

In der Elektrophorese erweisen sich die vier Spaltprodukte als identisch mit den nach Brown et al. (55) mit Trifluoracetanhydrid aus dem Gemisch der Mononukleotide hergestellten cyclischen Nukleosidmonophosphaten (Abb. 8).

Bezüglich des adeninhaltigen Spaltproduktes ist auf diesem Wege keine Entscheidung möglich, da cyclisches und offenes Adenosinmonophosphat bei pH 3,2 die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben.

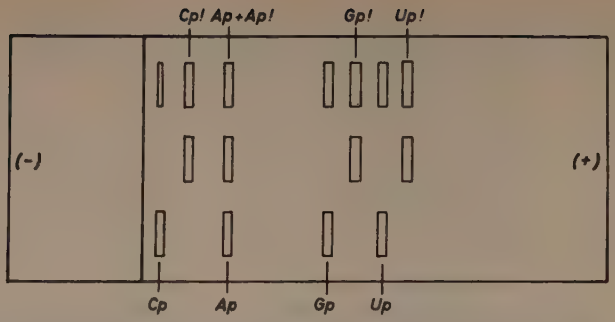


Abb. 8. Schematisches Elektropherogramm der RNS-Spaltprodukte mit dem Gemisch der vier cyclischen Nukleosid-Monophosphate als Referenz. Wegen des unvollständigen Umsatzes der Mononukleotide mit Trifluoracetanhydrid sind in der Referenz noch unveränderte Mononukleotide enthalten. Untere Reihe: Reine Mononukleotide als Vergleichssubstanzen.

Behandelt man die RNS-Spaltprodukte mit pankreatischer RNase, so treten die Banden der Uridylsäure und der Cytidylsäure neben denen der ursprünglichen Spaltprodukte auf, während erwartungsgemäß (56) die dem cyclischen Guanosinphosphat zuzuordnende Bande unbeeinflußt bleibt (Abb. 9). Das Mengenverhältnis von cyclischen zu offenen Pyrimidinnukleotiden verschiebt sich mit zunehmender Inkubationsdauer zugunsten der letzteren. Nach langen Inkubationszeiten tritt außer den nunmehr vollständig in die Pyrimidinnukleotide umgewandelten Spaltprodukten auch Guanylsäure neben dem guaninhaltigen Spaltprodukt auf.

Im Gegensatz zu dem Ergebnis der Hydrolyse mit pankreatischer RNase müßten bei der alkalischen Hydrolyse alle vier cyclischen Nukleosidphosphate in die offenen 2'- bzw. 3'-Nukleosidmonophosphate umgewandelt werden. Elektropherogramme des Alkalihydrolysates der RNS-Spaltprodukte lassen keine cyclischen Nukleosidphosphate mehr erkennen.

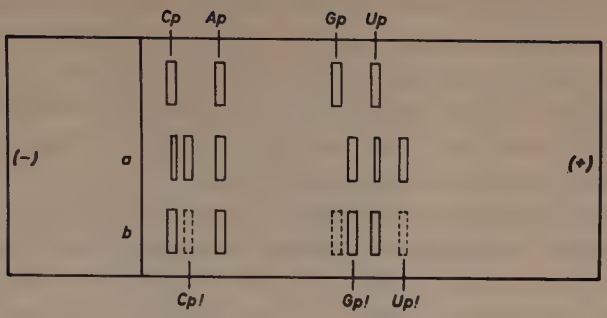


Abb. 9. Schematisches Pherogramm der RNS-Spaltprodukte nach kurzzeitiger (a) und nach langdauernder (b) Inkubation mit pankreatischer RNase; pH 3,2, 0,05 m Ammoniumformiat. Obere Reihe: Reine Mononukleotide als Vergleichssubstanzen.

Um auch bezüglich des adeninhaltigen Spaltproduktes eine Entscheidung treffen zu können, wurde Ap! nach der Methode von Khorana et al. (57) mit Dicyclohexylcarbodiimid synthetisiert. Bei pH 7,5 wandern die cyclischen Di-Ester der Nukleoside etwa halb so schnell wie die offenen Nukleotide. Das Adenosin-Derivat, das unter der Wirkung der ribosomalen RNase entsteht, hat bei pH 7,5 die gleiche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit wie synthetisches Ap!.

Um auszuschließen, daß es sich um die cyclischen 3',5'-Nukleosidmonophosphate handelt, wurden die Spaltprodukte alkalisch hydrolysiert. Aus den cyclischen 3',5'-Nukleosidphosphaten hätte sich unter diesen Bedingungen das Gemisch der Nukleosid-3'-Phosphate und der Nukleosid-5'-Phosphate bilden müssen (58). Letztere hätten auf Grund ihrer freien 2'- und 3'-Hydroxylgruppen eine starke Perjodat-Reaktion bedingt. Im Gegensatz zu den 5'-Nukleosidphosphaten zeigt das alkalische Hydrolysat der RNS-Spaltprodukte keine Perjodat-Reaktion. Ribosomale RNase spaltet also die RNS hauptsächlich zu den vier cyclischen 2',3'-Nukleosidmonophosphaten.

Die drei zusätzlichen Spaltprodukte (siehe Abb. 7) standen noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um identifiziert zu werden. Es könnten Oligonukleotide sein, die einen nicht oder nur schwer spaltbaren Rest der RNS-Ketten darstellen. Die Vermutung, daß es sich um Endprodukte und nicht um Zwischenprodukte der Spaltung handelt, wird auch durch den Befund nahegelegt, daß die drei zusätzlichen Spaltprodukte nach kurzzeitiger Inkubation nie in größeren Mengen zu beobachten sind. Eine ähnliche Rolle spielen wahrscheinlich die Nukleotide, die die löslichen und unlöslichen Ribosomenproteine (siehe dort) begleiten.

d) Wirkungsweise des Enzyms.

Nach kurzzeitiger Inkubation von RNS mit ribosomaler RNase treten in Elektropherogrammen bei pH 3,5 neben einer großen Menge nicht wandernder RNS stets die vier cyclischen Mononukleotide auf. Dies ließ vermuten, daß das Enzym eine Exonuklease ist. Da ein Enzym, das vom Ende der RNS-Kette her successive Mononukleotide abspaltet, ein wertvolles Hilfsmittel für die Erforschung der Sequenz der Ribonukleinsäuren wäre, sollte die Frage, ob es sich um eine Exo- oder um eine Endo-Nuklease handelt, auf folgendem Wege experimentell entschieden werden:

Bei der Spaltung von RNS mit ribosomaler RNase entsteht eine Anzahl neuer Endgruppen in Form der cyclischen 2',3'-Phosphate. Öffnet man durch Ansäuern die cyclischen Di-Ester und spaltet anschließend mit Prostata-Phosphomonoesterase die Phosphatreste ab, so ist im Falle einer Exo-Nuklease zu erwarten, daß hierbei gleiche molare Mengen von Nukleosiden und anorganischem Phosphat entstehen. Wird die RNS dagegen zunächst in größere Bruchstücke zerlegt, so sollte die Menge an anorganischem Phosphat die Menge der freien Nukleoside übertreffen, und dies in umso stärkerem Maße, je kürzer die Inkubationszeit mit der RNase gewählt wurde.

Leider ergaben sich bei der Gewinnung einer von Phosphodiesterase vollständig befreiten Prostata-Phosphomonoesterase erhebliche Schwierigkeiten. Bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose unter den von Ostrowski und Tsugita (59) angegebenen Bedingungen erschienen die Gipfel nicht in der von den Autoren beobachteten Reihenfolge. Die Versuche wurden mit einer Fraktion begonnen, die nur noch eine Spur Phosphodiesterase enthielt. Sie scheiterten jedoch daran, daß die Bestimmung des abgespaltenen Phosphats nach Fiske und King (60) in Gegenwart der säurelöslichen RNS-Bruchstücke versagte, da letztere mit Ammonmolybdat schwerlösliche Niederschläge bilden.

Deshalb wurde zur Ermittlung der Wirkungsweise des Enzyms der methodisch einfachere Weg beschritten und die Abnahme der Sedimentationskonstanten und der Viskosität bei kurzzeitiger Inkubation mit ribosomaler RNase verfolgt.

Die Sedimentationskonstante von ribosomaler RNS, die fünf Minuten bei 37° C mit einer kleinen Menge einer verdünnten E 2-Präparation behandelt wurde, ist gegenüber der Kontrolle bereits um drei Svedberg-Einheiten erniedrigt. Die Form des Sedimentationsgradienten läßt deutlich die Heterogenität der entstandenen Spaltprodukte erkennen (Abb. 10,11). Nur 1,3 % der eingesetzten RNS werden bei dieser Behandlung säurelöslich. Nach 10 Minuten ist der säurelösliche Anteil auf 2,8 % gestiegen. Das Sedimentationsbild dieser Probe zeigt ein Gemisch von Spaltprodukten verschiedener Sedimentationskonstanten zwischen 6 S und 12 S, das nicht durch Abspaltung von 2,8 % der Mononukleotide von den Enden gleichschwerer RNS-Moleküle entstanden sein kann (Abb. 12). Nimmt man an, daß im ungünstigsten Fall nur 5 % bis 10 % der vorhandenen Moleküle von einer Exonuklease angegriffen wurden, so sollte das durchschnittliche Molekulargewicht der gespaltenen Moleküle 56 % bis 72 % des Ausgangsmolekulargewichts betragen. Tatsächlich befindet sich im Gebiet kleinerer Molekularge-

wichte ein viel höherer Prozentsatz der eingesetzten RNS.

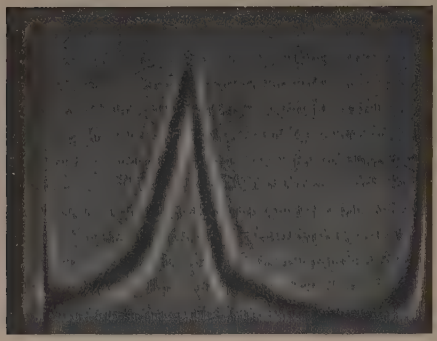


Abb. 10. Philpot-Svensson-Sedimentationsbild ribosomaler RNS, die ohne Enzym 10 Minuten bei 37° C inkubiert wurde; nach 62 Minuten, bei 51 000 UPM, $s_{20} = 14,7$.

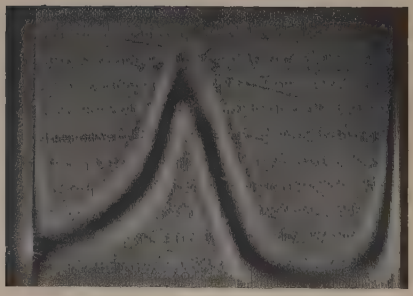


Abb. 11. Dieselbe RNS nach einer fünfminütigen Inkubation mit ribosomaler RNase bei 37° C; nach 74 Minuten Zentrifugation bei 51 000 UPM, $s_{20} = 11,7$.

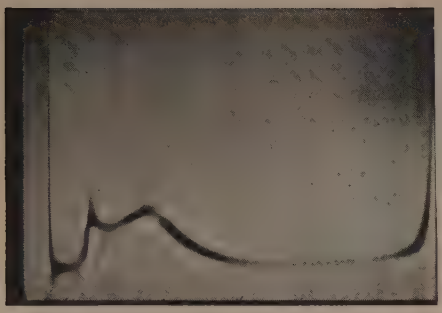


Abb. 12. Dieselbe RNS, nachdem sie 10 Minuten bei 37° C mit ribosomaler RNase behandelt worden war; nach 60 Minuten Zentrifugation bei 51 000 UPM.

Nimmt man an, daß 50 % bis 70 % der Moleküle von einer Exo-Ribonuklease angegriffen wurden, so sollte das durchschnittliche Molekulargewicht der verkürzten Moleküle zwischen 94 % und 96 % des Ausgangsmolekulargewichts liegen. Das Sedimentationsbild zeigt jedoch eine Anhäufung von Spaltprodukten mit Sedimentationskonstanten um 6 S, was einer stärkeren Abnahme des Molekulargewichtes entspricht[+)].

Der zeitliche Verlauf der Viskositätsabnahme bei der enzymatischen Spaltung von Nukleinsäuren erlaubt ebenfalls eine Unterscheidung von Endo- und Exonukleasen.

[+)] Das zu erwartende Durchschnittsmolekulargewicht der Spaltprodukte $\bar{M}$ bei Einwirkung einer Exonuklease auf RNS vom einheitlichen Molekulargewicht M_o errechnet sich bei 10-Min.-Inkubation (2,8 % säurelöslich) nach: $\bar{M} = M_o\left(1 - \frac{0,028}{y}\right)$, wenn y der Bruchteil der Moleküle ist, die angegriffen wurden.

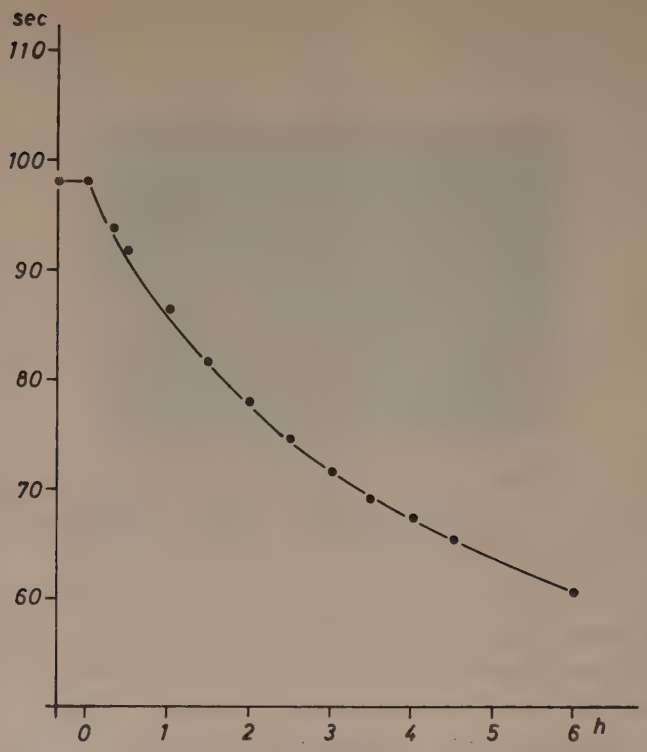


Abb. 13. Zeitliche Abnahme der Viskosität hochmolekularer RNS (57 mg/ml) bei der Inkubation mit einer kleinen Menge ribosomaler RNase in Gegenwart von 0,8 m Harnstoff bei 30° C. (Jeder achte der gemessenen Werte wurde aufgetragen.)

Verfolgt man die Spaltung hochmolekularer RNS mit ribosomaler RNase viskosimetrisch und mißt gleichzeitig die Entstehung säurelöslicher Nukleotide in einer parallel inkubierten Probe, so ergibt sich das folgende Bild:

1. Der zeitliche Verlauf der Viskositätsabnahme zeigt die analoge Kurvengestalt wie sie auch bei der Spaltung von RNS durch pankreatische RNase beobachtet wurde (61).
2. Während die spezifische Viskosität in 6 Stunden um 40,8 % sinkt, werden nur 5,3 % der eingesetzten RNS

säurelöslich. Würde das Molekulargewicht bei der Spaltung durch eine Exonuklease um 5,3 % abnehmen, so ergäbe sich nach Staudinger nur eine 3,5%ige Viskositätsabnahme ($\eta = K \cdot M^a$; a = 0,07).

Verwendet man zu einem entsprechenden Versuch eine RNS höheren Molekulargewichts (s_{20} = 14,7) und eine größere Enzymmenge, so erhält man den typischen Steilabfall der Viskosität in den ersten Minuten nach Enzymzusatz (Abb. 14). In dem

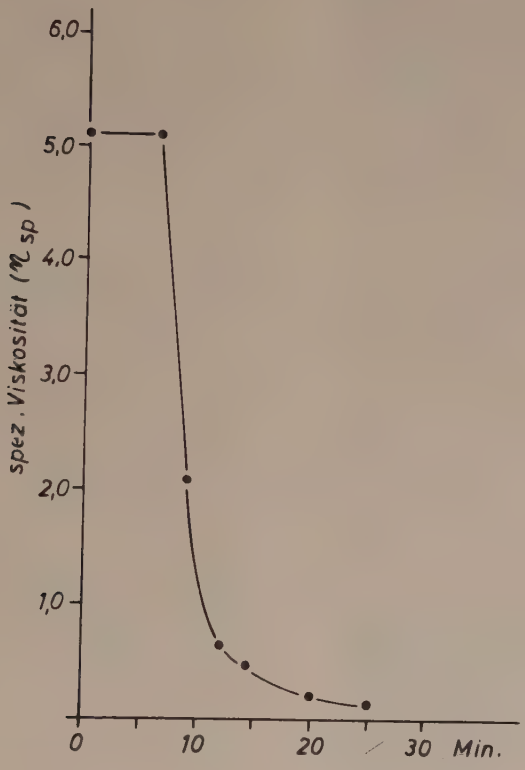


Abb. 14. Zeitliche Abnahme der Viskosität hochmolekularer RNS (40 mg/ml) während der Spaltung mit einer größeren Menge ribosomaler RNase bei 37° C.

dargestellten Falle betrug die Abnahme der spezifischen Viskosität in den ersten 6 Minuten 87,3 %, während nur 7 % der eingesetzten RNS säurelöslich wurden.

Diese Versuche schließen mit Sicherheit aus, daß die ribosomale RNase die RNS nach einem rein exonukleatischen Mechanismus spaltet. Die Befunde können am besten durch die Vorstellung gedeutet werden, daß das Enzym die RNS zuerst in größere Bruchstücke zerlegt, diese dann aber hauptsächlich von den nunmehr in größerer Zahl vorhandenen Kettenenden aus successive spaltet.

In der 1-RNS steht ein Substrat mit definierten Endgruppen zur Verfügung: an ihrem einen Kettenende trägt sie einen in 5'-Stellung mit dem endständigen Nukleosid verknüpften Phosphatrest, während am anderen Kettenende im nicht-aminoacylierten Zustand die beiden freien 2'- und 3'-Hydroxylgruppen stehen (62).

Auf die Spaltungsgeschwindigkeit mit ribosomaler RNase hat das 5'-Phosphat keinen Einfluß: Mit Prostata-Phosphomonoesterase behandelte 1-RNS wird genauso schnell von ribosomaler RNase abgebaut wie unbehandelte (Abb. 15).

Lösliche RNS wird erheblich langsamer gespalten als hochmolekulare RNS. Der Unterschied in den Spaltungsgeschwindigkeiten nimmt mit steigender Harnstoffkonzentration ab. Aus dem in Abb. 16 dargestellten Experiment geht hervor, daß 1-RNS aus E. coli in Gegenwart von 1,2 m Harnstoff bei 26° C 2,8 mal langsamer abgebaut wird als ribosomale E.coli-RNS. Im Falle der Ribonukleinsäuren aus Hefe ist der Unterschied auch in Abwesenheit von Harnstoff geringer (Abb. 17).

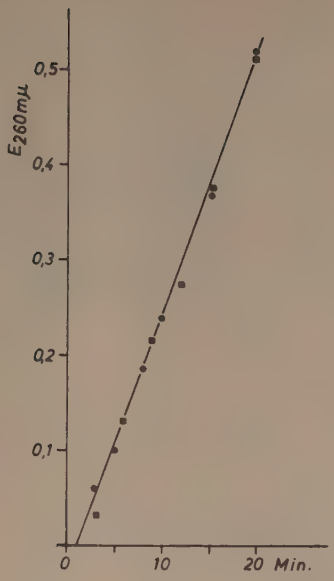


Abb. 15.
Spaltung von Hefe-1-RNS mit ribosomaler RNase vor (■) und nach (●) Behandlung mit Prostata-Phosphomonoesterase.

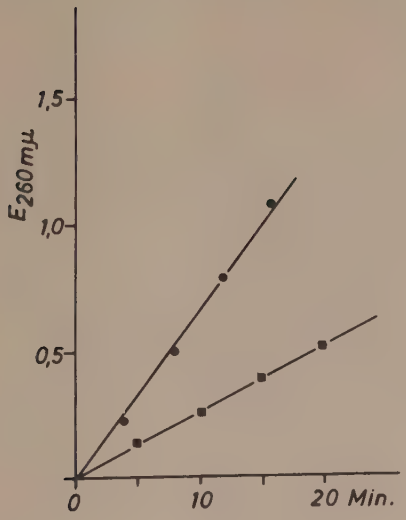


Abb. 16.
Abbau von 1-RNS (■) und Ribosomen-RNS aus E. coli mit ribosomaler RNase in Gegenwart von 1,2 m Harnstoff bei 26° C. Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten = 2,8.

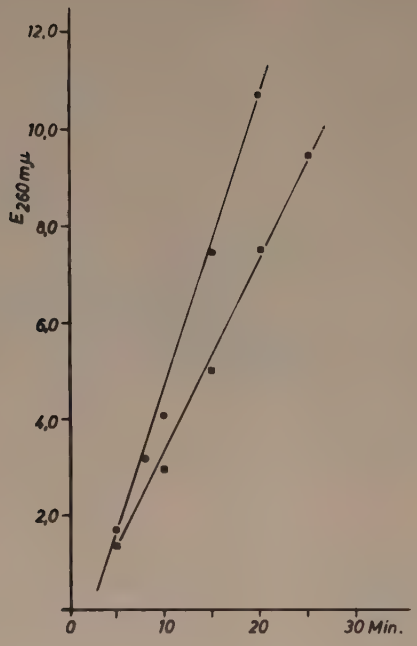


Abb. 17.
Abbau von 1-RNS (■) und hochmolekularer RNS (●) aus Hefe bei 37° C ohne Harnstoff. Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten = 1,5.

e) Lokalisierung der ribosomalen RNase in den 30 S-Ribosomen.

Schon David Elson und nach ihm Spahr und Hollingworth stellten sich die Frage, ob zwischen 30 S- und 50 S-Ribosomen ein Unterschied im Gehalt an ribosomaler RNase bestehe. In beiden Arbeitsgruppen wurden durch differentielle Ultrazentrifugation Präparationen von 50 S-Ribosomen mit unterschiedlichem Gehalt an 30-S-Ribosomen hergestellt. Die RNase-Aktivität ging jeweils parallel mit dem Gehalt an 30 S-Ribosomen, und Elson schloß durch Extrapolation, daß die 50 S-Ribosomen keine RNase enthalten.

Differentielle Ultrazentrifugation führt auch nach oftmaliger Wiederholung nicht zur vollständigen Befreiung der 50 S-Ribosomen von den 30 S-Partikeln. Die Frage nach dem RNase-Gehalt der 50 S-Ribosomen läßt sich besser mit Hilfe der reinen Partikeln beantworten, die man durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten gewinnen kann (32). Abbildung 18 zeigt das Ergebnis einer solchen Zentrifugation.

Fügt man zu allen Fraktionen, die aus dem Zentrifugenbecher entnommen wurden, einen Überschuß von RNS als Substrat und inkubiert anschließend in Gegenwart von EDTA und Harnstoff, so kommt es nur in denjenigen Fraktionen zum Abbau der RNS, die 30 S-Ribosomen enthalten.

Ferner bildet sich bei der Inkubation der zum 30 S-Gipfel gehörigen Fraktionen mit EDTA und Harnstoff bei 37° C schon nach wenigen Minuten der Niederschlag des ribosomalen Strukturproteins, während die Fraktionen des 50 S-Gipfels unter den gleichen Bedingungen nach einer Stunde nur eine schwache Opaleszenz zeigen. Nach Zusatz von 10 γ pankreatischer RNase kommt es auch hier in wenigen Minuten zur Präzipitation des ribosomalen Strukturproteins.

Die ribosomale RNase ist also ein Bestandteil der 30 S-Ribosomen, während die 50 S-Partikeln keine RNase enthalten.

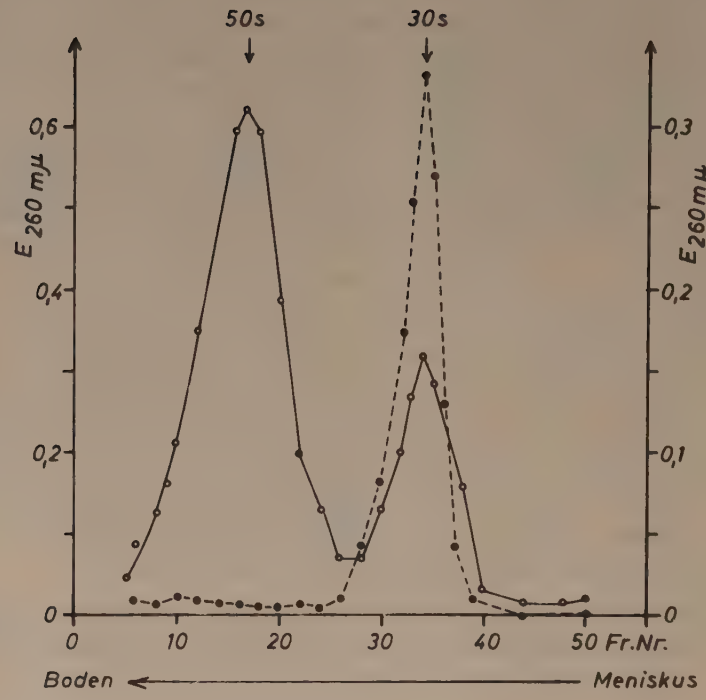


Abb. 18. Lokalisierung der ribosomalen RNase in den 30 S-Ribosomen nach Trennung der 50 S- und 30 S-Ribosomen durch Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten.

o——o : Extinktion verdünnter Aliquote aus den Fraktionen bei 260 mμ. Rechte Ordinate.

●-----● : Extinktion der nach Inkubation der Fraktionen mit 2 m Harnstoff, 0,01 m EDTA und RNS-Überschuß entstandenen säurelöslichen Nukleotide bei 260 mμ; linke Ordinate.

f) Aktivierung und Hemmung der ribosomalen RNase.

Aktivierung mit Harnstoff.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Zersetzung der Ribosomen durch Harnstoff, Guanidiniumchlorid und andere Wasserstoffbrückensprenger ausgelöst werden kann. Hierbei kommt es zum vollständigen Abbau der hochmolekularen ribosomalen RNS durch die ribosomale RNase (34,51). Auch nach der Freisetzung des Enzyms aus dem Ribosomenverband ist es durch Harnstoff aktivierbar. Die Spaltungsgeschwindigkeit mit hochmolekularer RNS als Substrat steigt bis zu einer Harnstoffkonzentration von 1,2 m an und bleibt bei weiterer Steigerung der Harnstoffkonzentration konstant. Mit l-RNS als Substrat wird das Plateau erst bei 1,6 m Harnstoff erreicht (Abb. 19).

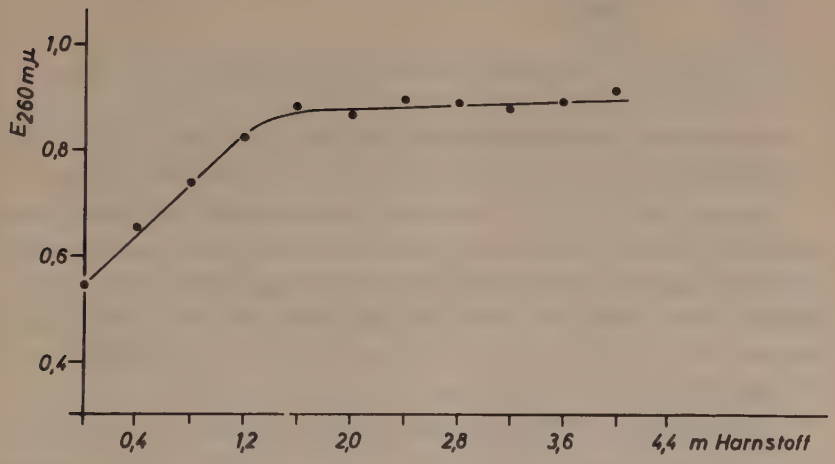


Abb. 19. Aktivierung der ribosomalen RNase mit steigender Harnstoffkonzentration und l-RNS als Substrat. Die Proben wurden 10 Minuten bei 26° C inkubiert.

Hemmung durch biogene Amine.

Der Abbau der ribosomalen RNS nach Spaltung der Ribosomen mit Harnstoff und EDTA kann durch die biogenen Amine Putrescin und Cadaverin stark verzögert werden. Es lag daher nahe, die Wirkung der biogenen Amine auf das angereicherte Enzym zu untersuchen. Die Ergebnisse der Versuche mit Putrescin sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 4.

Hemmung der ribosomalen RNase durch 0,37 m Putrescin in Natriumphosphat-Puffern bei 37° C.

pH	Puffer-Molarität	Harnstoff	% Hemmung
5,5	0,1	0,4 m	34
8,0	0,1	0,4 m	98
6,7	0,05	0,4 m	87
6,7	0,05	--	70

Mit 0,33 m Trimethylendiamin erreicht man bei pH 8,0 und in Gegenwart von 0,4 m Harnstoff eine 99,5%ige Hemmung.

Spermin kann nicht in den hier angegebenen Konzentrationen verwendet werden, da es mit RNS schwer lösliche Niederschläge bildet. Auch Phosphatpuffer müssen wegen der Schwerlöslichkeit von Sperminiumphosphat vermieden werden. Mit 0,001 m Spermin erhält man in 0,05 m Tris-Sulfat nur eine 6%ige Hemmung der ribosomalen RNase.

Da die Amine bei den angewendeten pH-Werten zum Teil als Kationen vorliegen, beruht ein Teil der beobachteten Hemmung auf der durch die Ammoniumsalze bedingten Erhöhung der Ionenstärke (51). Daß es sich jedoch nicht um einen reinen Salz-Effekt handelt, geht daraus hervor, daß die von den Aminen bedingte Ionenstärke mit steigendem pH-Wert abnimmt , während ihre hemmende Wirkung ansteigt (siehe Tab. 4). Ferner wirkt Putrescin bei pH 5,5 noch hemmend (34 %), während Kochsalz

in höherer Konzentration bei diesem pH-Wert stark aktiviert (Tab. 5).

Tab. 5.

Einfluß von 0,45 m Natriumchlorid auf die Aktivität der ribosomalen RNase; in 0,1 m Natriumphosphatpuffer, 0,4 m Harnstoff.

pH 5,5	75 % Aktivierung
pH 8,0	84 % Hemmung

Einfluß von S-H-Reagentien.

Zur Hemmung des Enzyms mit p-Chloromercuribenzoat (PCMB) sind relativ hohe Konzentrationen des Hemmstoffs notwendig (Abb. 20).

Die PCMB-Hemmung wird durch Glutathion vollständig aufgehoben. Überschüssiges Glutathion oder Glutathion allein führt zu einer geringfügigen Hemmung des Enzyms. Thioglykol dagegen beschleunigt die Spaltung der RNS durch ribosomale RNase in geringem Umfang.

In einem gewissen Gegensatz zu diesem geringen und wechselnden Einfluß von S-H-Agentien scheint die Oxydationsempfindlichkeit des Enzyms zu stehen. Spahr und Hollingworth können das säulenchromatographisch gereinigte Enzym nur durch Zusatz von Mercaptalbumin längere Zeit stabil erhalten (53). Mit 0,005 m Benzochinon als Oxydationsmittel sinkt die Aktivität des Enzyms in 80 Minuten auf 25 % des Ausgangswertes (Abb. 21).

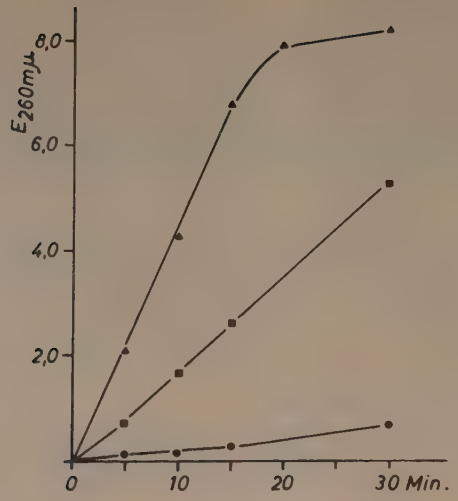


Abb. 20. Hemmung der ribosomalen RNase mit PCMB bei pH 7,2 in Gegenwart von 0,4 m Harnstoff; 37° C.

▲——▲ : Kontrolle, ohne PCMB
■——■ : mit $8{,}25.10^{-4}$ m PCMB; 63 % Hemmung
●——● : mit $8{,}25.10^{-3}$ m PCMB; 97 % Hemmung

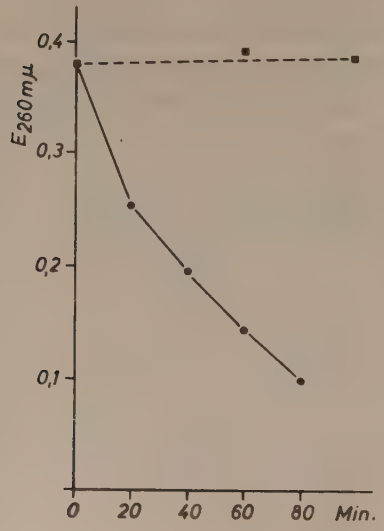


Abb. 21. Inaktivierung der ribosomalen RNase mit 0,005 m Benzochinon bei pH 6,6 und 37° C. Einzelne Proben wurden nach den angegebenen Zeiten aus dem Inkubationsgemisch entnommen und 8 Minuten bei 37° C und in Gegenwart von 0,4 m Harnstoff mit RNS inkubiert.

(■----■ Enzym ohne Chinon)

Nach G. Pfleiderer (63) wird eine wesentlich größere Menge eines typischen S-H-Enzyms - der Milchsäure-Dehydrogenase - durch 0,001 m Chinon in der gleichen Zeit fast vollständig inaktiviert. Prüft man den Einfluß des Chinons nicht durch Präinkubation des Enzyms und anschließende Aktivitätsbestimmung, sondern indem man das Chinon dem Enzym-Substrat-Gemisch zusetzt, so erweist es sich als unwirksam (siehe Tab. 6).

Tab. 6.

RNS wurde mit ribosomaler RNase in Gegenwart von Chinon und 0,4 m Harnstoff bei 37° C und pH 6,6 inkubiert. Die Bildung säurelöslicher Nukleotide wurde mit Hilfe ihrer Extinktion bei 260 mμ verfolgt.

Zeit	Kontrolle	$5 \cdot 10^{-4}$ m Chinon	$5 \cdot 10^{-3}$ m Chinon
10'	3,96	3,87	3,90
15'	6,10	6,10	5,98

Die Oxydationsempfindlichkeit der ribosomalen RNase kann jedoch nicht auf der Oxydation freier S-H-Gruppen beruhen, da N-Äthylmaleimid die Aktivität des Enzyms nicht vermindert (Abb. 22). Auch die zehnfache Konzentration von N-Äthylmaleimid (0,01 m) hat keinen Einfluß auf die Spaltungsgeschwindigkeit. Die ribosomale RNase gehört also nicht zu den Enzymen, an deren aktivem Zentrum freie S-H-Gruppen beteiligt sind.

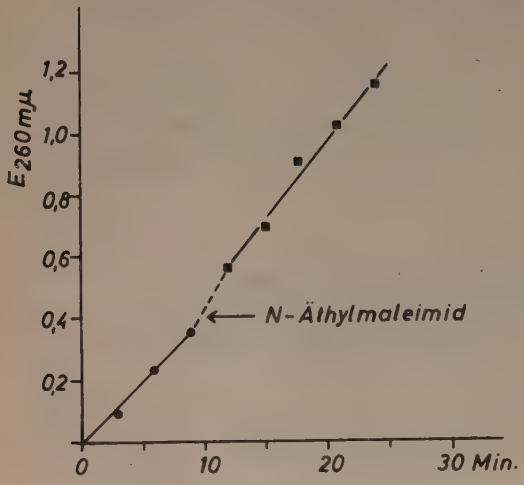


Abb. 22.
Spaltung von RNS mit ribosomaler RNase vor (●) und nach (■) Zusatz von N-Äthylmaleimid zu einer Endkonzentration von 0,001m; bei 37° C, pH 6,6 und in Gegenwart von 0,4m Harnstoff.

Hemmung mit Frankonit.

Die Gewinnung hochmolekularer RNS aus Pflanzenviren oder aus Ribosomen scheiterte häufig daran, daß während der Aufarbeitung Ribonukleasen einwirken könnten. Fraenkel-Conrad begegnete dieser Schwierigkeit durch den Zusatz feiner Suspensionen von Bentonit, einer sauren Tonerde. Dabei genügten geringe Mengen zur vollständigen Inaktivierung basischer Ribonukleasen und Phosphodiesterasen (64).

Auch die ribosomale RNase wird durch Frankonit-Suspensionen vollständig gehemmt (Abb. 23). Bei den geringen Frankonit-Konzentrationen, die zur Hemmung erforderlich sind, wird das Enzym zusammen mit den anderen in E 1 enthaltenen basischen Proteinen adsorbiert. Die Proteinkonzentration sinkt dabei auf 54 % des Ausgangswertes, und der Überstand ist frei von RNase (Abb. 24). Die Hemmung wird nicht durch Adsorption der säurelöslichen RNS-Spaltprodukte vorgetäuscht. Hierzu sind höhere Frankonit-Konzentrationen erforderlich. So wird z.B. die Extinktion eines Spaltungsendproduktes bei 260 mμ durch 2,6 mg Frankonit/ml um 6 % vermindert. Unterbricht man

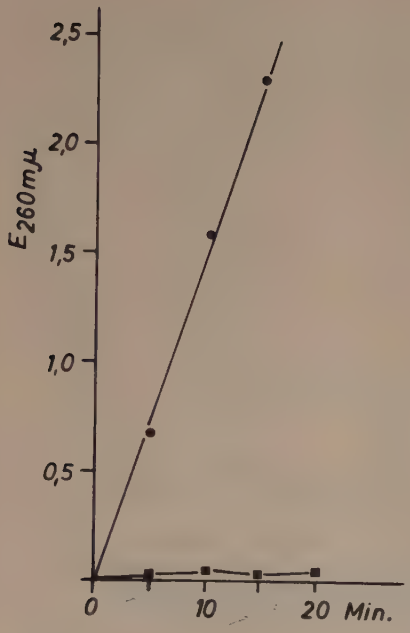


Abb. 23.
Hemmung der ribosomalen RNase mit Frankonit:
- ■ 0,36 mg Frankonit/ml; pH 6,8
- ● Kontrolle, ohne Frankonit; pH 5,7 .

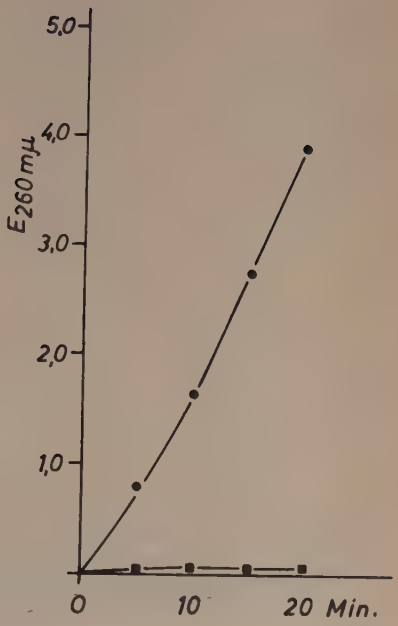


Abb. 24.
Präinkubation der ribosomalen RNase mit 2 mg Frankonit/ml, 1 Minute bei 37° C und anschließende Aktivitätsmessung im Überstand (■) sowie am Ausgangsenzym (●).

die Spaltung von RNS mit ribosomaler RNase nach 15 Minuten durch Zusatz von 4,4 mg Frankonit/ml, so sinkt die Extinktion auf 22,6 % des 15-Minuten-Wertes (Abb. 25). Bei ausschließlicher Adsorption des Enzyms hätte sich die Extinktion nach dem Frankonitzusatz nicht verändert. Bei kinetischen Versuchen mit Frankonit sollte daher die Konzentration des Hemmstoffs 0,2 % nicht übersteigen.

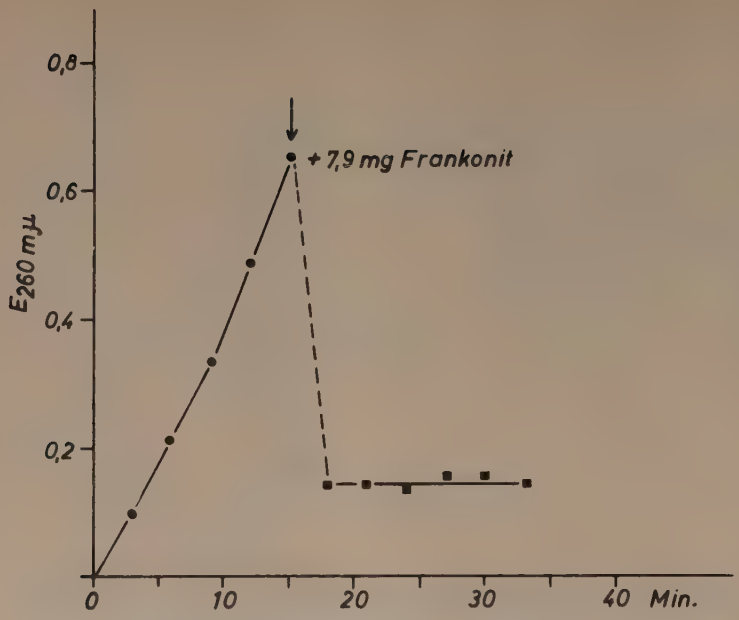


Abb. 25. Extinktionsabnahme nach Zusatz einer zu großen Frankonitmenge (4,4 mg/ml) zu einem 15-Minuten-Inkubationsgemisch von RNS mit ribosomaler RNase; pH 7,5, 30° C.

g) Zur Stabilität des Enzyms.

Innerhalb des Ribosomenverbandes ist die ribosomale RNase gegen Alkoholfällung und gegen Extraktion der Ribosomen mit einem Ameisensäure-Essigsäure-Puffer pH 1,9 unempfindlich. Sowohl am Extraktionsrückstand als auch an einem Methanol-Trockenpulver aus Ribosomen kann man den autokatalytischen Verlauf der Zersetzung mit EDTA und Harnstoff beobachten (siehe Abb. 26).

Auch bei der Fällung gereinigter Präparationen (E 1 oder E 2) mit 0,3 n Perchlorsäure in Gegenwart von RNS wird das Enzym nicht inaktiviert. Alkoholfällung in Abwesenheit des Substrats dagegen zerstört die enzymatische Wirksamkeit vollständig.

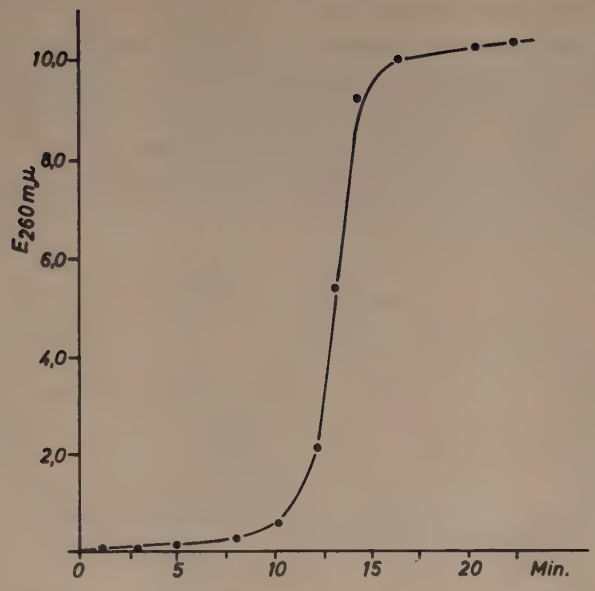


Abb. 26. Zersetzung der Ribosomen mit EDTA und Harnstoff bei 37° C. Aufgetragen ist die Extinktion der säurelöslichen Nukleotide gegen die Inkubationszeit.

Häufiges Einfrieren und Auftauen von Lösungen der ribosomalen RNase vermindert ihre Aktivität nicht. Bei Ribosomen-Lösungen kommt es nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen zu einer merklichen Freisetzung säurelöslicher Nukleotide.

Die ribosomale RNase kann 24 Stunden bei 37° C ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Bei 80° C sinkt ihre Aktivität in 6 Minuten auf 45 % des Ausgangswertes.

h) Immunologische Versuche.

Ribosomale RNase reagiert nicht mit Kaninchen-Antiserum gegen pankreatische RNase. Auch mit den konzentriertesten

E 2-Präparationen entsteht kein Immunpräzipitat. Die untere Grenze der Nachweisbarkeit von pankreatischer RNase mit Hilfe des Präzipitationstests verschiebt sich nicht zu höheren RNase-Konzentrationen, wenn man das Serum vorher mit E 2 mischt; demnach kommt es auch nicht zu einer Bindung der ribosomalen RNase an den Antikörper gegen das Pankreas-Enzym. Während letzteres von dem Antiserum zu 94 % gehemmt wird, hat das Serum keinen Einfluß auf die Aktivität der ribosomalen RNase (Abb. 27).

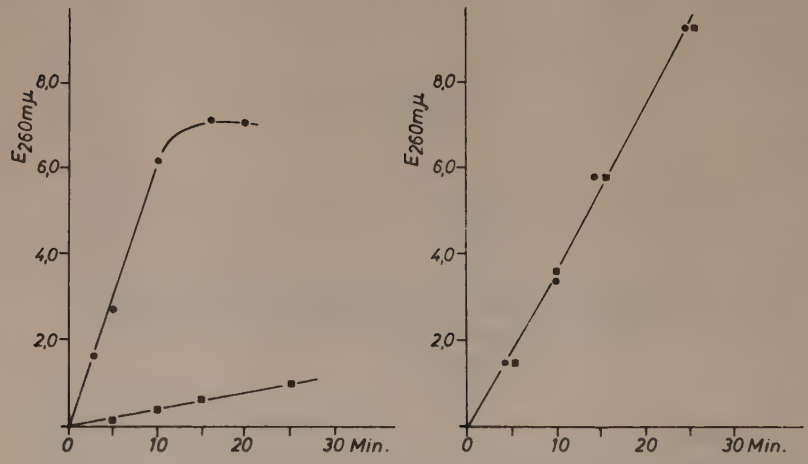


Abb. 27,a.
Spaltung von RNS durch pankreatische RNase (0,25/ Ansatz) in Gegenwart von Antiserum (■) und von Kontrollserum (●) bei 37°C.

b.
Spaltung von RNS durch ribosomale RNase (E 2) in Gegenwart von Antiserum (■) gegen pankreatische RNase und von Kontrollserum (●) bei 37° C.

Beide Versuche wurden in Abwesenheit von Harnstoff durchgeführt.

Im Gegensatz zur pankreatischen RNase vermag die ribosomale RNase alle Internukleotidbindungen zu spalten. Die immunologischen Versuche zeigen, daß diesem Unterschied in der

Spezifität eine Andersartigkeit der Struktur entspricht. Demgegenüber bestehen in einer Anzahl von Eigenschaften auffällige Ähnlichkeiten zwischen der ribosomalen und der pankreatischen RNase, die hier aufgezählt seien:

Das pH-Optimum beider Enzyme liegt bei pH 7,8 bis 8,0 (53,65). Beide sind durch Polyanionen hemmbar (50,66). Die Thermostabilität beider Enzyme ist im Sauren größer als im Alkalischen (50,67). Die Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Konzentration einwertiger Kationen weist jeweils ein Optimum auf, das beim Pankreas-Enzym bei 0,05 m, für die ribosomale RNase bei 0,3 m liegt. Zweiwertige Kationen dagegen hemmen beide Enzyme schon bei relativ geringen Konzentrationen (50,68). Auch die pankreatische RNase ist in Gegenwart hoher Harnstoff-Konzentrationen aktiv (50,69).

Mit einem Kaninchen-Antiserum gegen E.coli-Ribosomen[+)] bildet ribosomale RNase (konzentriertes E 2) kein Immunpräzipitat. Das Antiribosomen-Serum beeinflußt die Aktivität des Enzyms ebensowenig wie das Antiserum gegen pankreatische RNase (Abb. 28).

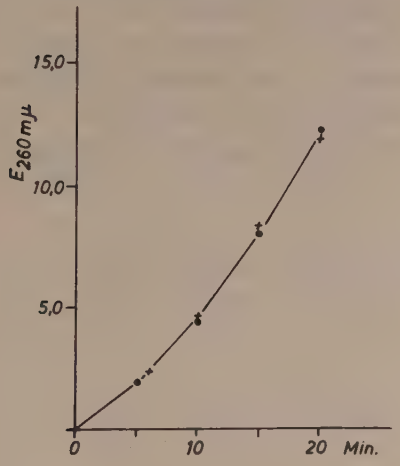


Abb. 28.
Spaltung von RNS durch ribosomale RNase (E 2) in Gegenwart von Anti-Ribosomen-Serum (+) und von Kontrollserum (●) bei 37° C.

[+)] Nur bei Verwendung sehr reiner Ribosomen gelingt es, ein Anti-Ribosomen-Serum herzustellen. Ungenügend gewaschene Ribosomen aus E. coli enthalten ein Toxin, das schon nach wenigen Injektionen zum Tod der Tiere führt.

2. Die sogenannte ribosomale Phosphatase.

Spahr und Hollingworth entdeckten bei der Chromatographie der löslichen Ribosomenproteine an IRC-50 eine Phosphomonoesterase mit einem pH-Optimum von 4,5. Sie konnten zeigen, daß das Enzym nur eine sehr geringe Affinität zu den Mononukleotiden hat, während Zuckerphosphate, Glycerinphosphate und Phosphorsäure-phenylester gespalten werden. Die Autoren hegten keinen Zweifel an der Zugehörigkeit des Enzyms zu den Ribosomen-Proteinen.

Die eigenen Untersuchungen sollten die Frage klären, ob die Phosphatase mit dem gleichen Recht als ein integrierender Bestandteil der Ribosomen betrachtet werden kann, wie die ribosomale RNase. Zweifel daran erschienen berechtigt, nachdem es nicht gelungen war, die Phosphatase nach Trennung der 30 S- und 50 S-Ribosomen durch Gradienten-Zentrifugation in einer der beiden Ribosomen-Sorten nachzuweisen. Keine der aus den Zentrifugenbechern erhaltenen Fraktionen reagierte mit p-Nitrophenylphosphat. Auch die aus den jeweiligen Fraktionen des 30 S- und des 50 S-Gipfels gewonnenen E 1-Präparationen enthielten keine Phosphatase-Aktivität. Nach einer Waschzentrifugation mit 20%iger Saccharose enthielten die Ribosomen nur noch 23 % der eingesetzten Phosphatase-Aktivität, während sich 54 % in den oberen zwei Dritteln der Waschüberstände befanden. Daraufhin wurde der Phosphatase-Gehalt von Ribosomen verschiedenen Reinheitsgrades untersucht.

Bezieht man die Phosphatase-Aktivität von E 1-Präparationen auf die Extinktion der eingesetzten Ribosomen bei 260 mμ, so ergeben sich folgende Werte:

Tab. 7.

Phosphatase-Gehalt von Ribosomen verschiedenen Reinheitsgrades.

Reinigung der Ribosomen durch:	Spaltungsgeschwindigkeit +) von p-Nitrophenylphosphat bezogen auf die Ribosomen-Extinktion
a. Zentrifugation aus Tris-Puffer	$2{,}0 \times 10^{-3}$
b. Zentrifugation über 20%ige Saccharose	$6{,}3 \times 10^{-4}$
c. Schütteln mit Arcton und anschließende Zentrifugation aus Tris-Puffer	$6{,}5 \times 10^{-4}$
d. Zentrifugation aus 0,6%igem Natriumdesoxycholat	$0{,}4 \times 10^{-4}$

+) Siehe Seite 83.

Die von Spahr und Hollingworth aufgefundene Phosphatase kann also nicht in dem selben Sinn als ein Ribosomenprotein bezeichnet werden wie die ribosomale RNase. Sie scheint vielmehr zu den an die Ribosomen adsorbierten Proteinen zu gehören, die nur mit intensiven Reinigungsmethoden weitgehend entfernt werden können. Natriumdesoxycholat, das zur Gewinnung lipoproteidfreier Ribosomen aus den Mikrosomen höherer Organismen dient, erweist sich auch hier als das am besten geeignete Mittel.

B. Niedermolekulare Bestandteile der Ribosomen

Zur Untersuchung der Ribosomen auf niedermolekulare Bestandteile extrahiert man sie mit Lösungsmitteln, in denen die Proteine und die hochmolekulare RNS unlöslich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Extrakte mit Methanol und mit saurem Puffer hergestellt.

I. Extraktion der Ribosomen mit einem Ameisensäure-Essigsäure-Puffer (AE-Puffer) pH 1,9.

Verwendet man zur Extraktion mit AE-Puffer Ribosomen, die durch mehrmaliges Zentrifugieren aus neutralem Tris-Puffer gewaschen wurden, so enthalten die Extrakte eine Fülle ninhydrin-positiver Substanzen. Von diesen wandern bei der Elektrophorese im gleichen Puffer (70) 20 zur Kathode und 2 zur Anode (Abb. 29). 15 der kathodisch wandernden Substanzen wurden mit folgenden Verbindungen identifiziert:
Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin;
Serin, Threonin, Leucin, Alanin, Glycin und Sarcosin;
Histidin, Lysin und Arginin;
Cadaverin, Putrescin und 1,3-Diaminopropan.

In Extrakten aus reinen, mit Saccharose, Arcton oder Natriumdesoxycholat gewaschenen Ribosomen findet man das Mengenverhältnis von Aminosäuren zu biogenen Aminen beträchtlich zugunsten der letzteren verschoben. Auch die Anzahl der nachweisbaren Aminosäuren nimmt stark ab: Glutaminsäure und Asparaginsäure scheinen in desoxycholat-gewaschenen Ribosomen zu fehlen; die neutralen Aminosäuren sind in Spuren nachweisbar, während Histidin, Lysin und Arginin in geringen Mengen vorhanden sind.

Die biogenen Amine lassen sich von den freien Aminosäuren besonders gut durch Elektrophorese bei pH 3,2 abtrennen (Abb. 30).

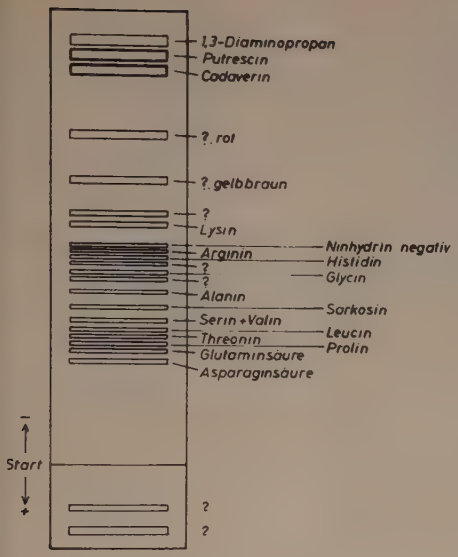


Abb. 29.
Schematisches Elektropherogramm bei pH 1,9 eines Extraktes aus Ribosomen, die mehrere Male mit Tris-Succinat-Magnesiumacetat-Puffer gewaschen wurden; nach einer Stunde, 6000 Volt.

1,3-DAP = 1,3-Diaminopropan,
Put = Putrescin,
Cad = Cadaverin,
Sarc = Sarcosin.

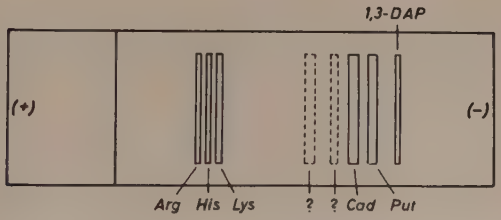


Abb. 30. Schematisches Elektropherogramm des Extraktes aus Ribosomen mit AE-Puffer pH 1,9; nach 30 Min. 6000 Volt, in 0,05 m Natriumacetat, pH 3,2.
Abkürzungen wie in der vorigen Abb.

Die quantitative Bestimmung der Amine mit Ninhydrin nach Moore (71) ergibt 25 mg Cadaverin + Putrescin pro Gramm Ribosomen als Gesamtmenge der beiden überwiegenden Komponenten. Viel geringer ist die Menge des Trimethylendiamins.

Abb. 31. Die im Ribosomen-Extrakt mit AE-Puffer pH 1,9 enthaltenen UV-positiven, kathodisch wandernden Substanzen.
Elektrophorese bei pH 1,9 in AE-Puffer, 75 Min. 3000 Volt.

Vergleicht man den Putrescin- und Cadaverin-Gehalt der Ribosomen mit dem Phosphorgehalt der ribosomalen RNS, so ergibt sich, daß etwa jeder dritte Phosphatrest der RNS von einer Aminogruppe der biogenen Amine neutralisiert wird. Die Menge der biogenen Amine ist auch in den reinsten Ribosomen nicht vermindert. Im Gegensatz zu dem größten Teil der freien Aminosäuren muß man daher die biogenen Amine als Bestandteile der Ribosomen ansehen. Die Frage, ob ein Teil der basischen Aminosäuren in dem gleichen Sinne wie die biogenen Amine zum Partikelverband gehören, kann auf Grund der bisherigen Untersuchungen nicht beantwortet werden. Daß in den reinsten Ribosomen noch geringe Mengen vor allem basischer Aminosäuren enthalten sind, kann auch als bevorzugte Bindung basischer Substanzen an Partikeln hohen RNS-Gehaltes gedeutet werden.

Die Extrakte von Ribosomen mit AE-Puffer pH 1,9 enthalten auch eine Reihe von Substanzen mit hoher UV-Extinktion, die bei der Elektrophorese zur Kathode wandern (Abb. 31). Ihre elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten entsprechen etwa denen der Nukleoside und der freien Basen. Ihre Menge ist sehr gering. Um deutlich sichtbare Banden zu erhalten, muß man den gesamten Extrakt aus 0,7 bis 1 g Ribosomen-Sediment auftragen. Zu ihrer Identifizierung müssen große Mengen reinster Ribosomen eingesetzt werden.

II. Extraktion der Ribosomen mit Methanol.

Der Extrakt reinster Ribosomen mit 80%igem Methanol enthält geringe Mengen der biogenen Amine und eine bei pH 3,7 langsam anodisch wandernde Substanz mit hoher UV-Extinktion (Abb. 32). Das UV-Spektrum der aus Pherogrammen eluierten Substanz deutet auf einen Gehalt an Adenin hin. Die alkalische Hydrolyse liefert hauptsächlich Adenylsäure. Daneben tritt ein bei pH 3,2 kathodisch wanderndes Hydrolysenprodukt auf.

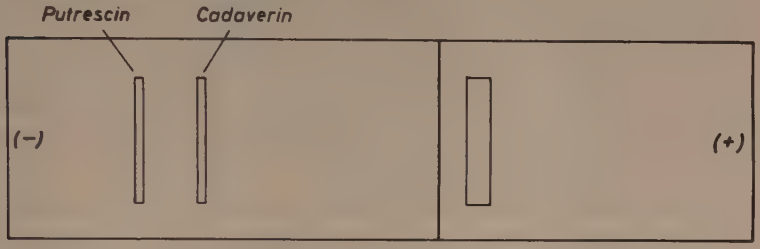


Abb. 32. Schematisches Elektropherogramm der im Methanol-Extrakt aus reinsten Ribosomen enthaltenen Substanzen; nach 60 Minuten bei 4000 Volt, in 0,05 m Ammoniumacetat-Puffer, pH 3,7.

Der Methanolextrakt von mit Puffer gewaschenen und dialysierten Ribosomen enthält Uracil, Hypoxanthin und eine dritte, noch nicht identifizierte Komponente mit hoher UV-Extinktion, die ebenfalls keine Ribose oder Desoxyribose und keine Phosphorsäure enthält (72). Spuren dieser Verbindungen sind auch noch in Ribosomen enthalten, die mit 0,3%igem Natriumdesoxycholat gewaschen wurden. Erst durch Fällung mit Essigsäure bei pH 4,1 oder mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung erhält man Ribosomen, in denen die freien Basen nicht mehr nachgewiesen werden können. Die Untersuchung solcher Ribosomen in der Ultrazentrifuge zeigt jedoch, daß diese Fällungsmethoden zu tiefgreifenden Änderungen der Ribosomenstruktur führen.

Da Uracil, Hypoxanthin und die nicht identifizierte Komponente im ribosomenfreien Zellsaft aus E.coli in reich-

lichem Maße enthalten sind, liegt es nahe, sie wie den größten Teil der basischen Aminosäuren zu den fest adsorbierten Verunreinigungen der Ribosomen zu zählen.

C. Diskussion

Die Frage, ob es ein Charakteristikum aller Ribosomen sei, daß sie eine latente RNase enthalten, kann bisher nicht beantwortet werden. Obwohl eine Reihe von Beobachtungen an Ribosomen verschiedener Spezies eine solche Verallgemeinerung nahelegt, ist es doch nur in wenigen Fällen berechtigt, von einer "ribosomalen" RNase zu sprechen.

Besondere Vorsicht ist bei Untersuchungen von Pankreas-Ribosomen geboten, da dieses Organ große Mengen Ribonuklease produziert. Palade und Siekevitz, die an den Ribosomen aus Meerschweinchen-Pankreas einen hohen RNase-Gehalt beobachteten, ziehen selbst die Möglichkeit in Betracht, daß bei der Behandlung der Ribosomen mit Desoxycholat ein Teil der Zymogengranula zerstört wird, und die in Freiheit gesetzte RNase die Ribosomen als adsorbierte Verunreinigung begleitet (73). Eine noch geringere Beweiskraft muß den Versuchen von Dickman und Trupin zugesprochen werden (74). Diese Autoren extrahieren Mikrosomen aus Mäuse-Pankreas unter Bedingungen, unter denen in der Tat eine ribosomale RNase freigesetzt würde, nämlich mit EDTA, Harnstoff und Citratpuffern. Es kann jedoch auf keine Weise ausgeschlossen werden, daß Ribonukleasen, die an andere Bestandteile der komplexen Mikrosomen-Fraktion gebunden sind, mit diesen Agentien ebenfalls extrahiert werden. Die von Ts'o und Mitarbeitern in den Ribosomen aus Erbsenkeimlingen beobachtete RNase wird von den Autoren selbst als Verunreinigung betrachtet (75). Wie sehr gerade die Ribosomen aus Erbsenkeimlingen zur Adsorption von Proteinen aus dem Zellsaft neigen, geht aus Untersuchungen von Webster hervor (76), wonach die Ribosomen allein in Gegenwart von Aminosäuren und ATP + GTP zur Synthese von Proteinen befähigt sind: Aminosäure-aktivierende Enzyme, Transfer-Enzym und l-RNS bleiben bei der Isolierung der Partikeln in ausreichenden Mengen adsorbiert.

Die Instabilität sehr reiner Rattenleber-Ribosomen führt Tashiro (77) in überzeugender Weise auf eine latente RNase zurück. Auch reine Hefe-Ribosomen zerfallen bei Entzug des Magnesiums mit EDTA (78) durch die Einwirkung einer ribosomalen RNase (79).

Im Gegensatz zu den vorher erwähnten Arbeiten, dienten bei den zuletzt genannten Untersuchungen sehr reine Ribosomen als Ausgangsmaterial. Für die Unterscheidung integrierender Bestandteile der Ribosomen von adsorbierten Verunreinigungen erweist sich die Zentrifugation aus desoxycholat-haltigen Puffern als das am besten geeignete Mittel.

Schon bei ihrer Isolierung vermögen die Ribosomen bis zu 20 % ihres Gewichtes an Protein aus dem Zellsaft zu adsorbieren. Aus Gemischen reiner Ribosomen mit Fremdproteinen lassen sich Ribosomen abzentrifugieren, die bis zu 70 % ihres eigenen Gewichtes an Fremdprotein adsorbiert haben (80). Der hohe Cytochromgehalt der Ribosomen von E. coli ist auf dieses starke Proteinbindungsvermögen zurückzuführen (33). Zur Entfernung adsorbierter Proteine reicht oft die Zentrifugation über konzentrierte Saccharose-Lösungen nicht aus.

Diese Befunde zeigen, wie kritisch die Entdeckung neuer "Ribosomen-Enzyme" beurteilt werden muß.

Die sogenannte ribosomale Phosphatase (53) kann durch Waschen mit Desoxycholat weitgehend von den Ribosomen abgetrennt werden (siehe S. 55). Auch D. Elson konnte dieses Enzym in gereinigten Ribosomen aus E. coli nicht nachweisen (81). In einer neueren Arbeit zeigt Elson, daß die von ihm entdeckte ribosomale Desoxyribonuklease (51) an die 70 S-Ribosomen gebunden ist. Bei der Dissoziation der 70 S-Ribosomen in 30 S- und 50 S-Partikeln wird das Enzym zusammen mit anderen Proteinen und einer kleinen Menge RNS freigesetzt (82). Die Gegenwart der abgespaltenen Produkte oder eines Teils von ihnen scheint für die Reaggregation der 30 S- und 50 S-Partikeln zu natürlichen 70 S-Ribosomen notwendig zu sein.

Über die von Elson nachgewiesene l-Prolylglycin-Peptidase liegen noch keine experimentellen Daten vor (81).

Isoliert man die 70 S-Ribosomen aus einem zellfreien Bakterienextrakt nach Inkubation mit ^{14}C-Aminosäuren und dissoziiert sie durch Erniedrigung der Magnesiumkonzentration in 30 S- und 50 S-Ribosomen, so wird ein großer Teil der in die 70 S-Partikeln eingebauten Radioaktivität in Form markierter Proteine freigesetzt (83). Es ist anzunehmen, daß zu dieser Fraktion auch neu synthetisierte Enzyme gehören, die in Extrakten aus 70 S-Ribosomen als "Ribosomen-Enzyme" in Erscheinung treten.

In Ribosomen aufgefundene Enzyme sollten also stets daraufhin untersucht werden, ob sie zu der Fraktion der neusynthetisierten Proteine gehören und als solche von den 70 S-Ribosomen lediglich durch Dissoziation in 30 S- und 50 S-Partikeln ablösbar sind. Solche Enzyme müssen sich durch ihre höhere Synthese-Geschwindigkeit von denen unterscheiden, die nach Art der ribosomalen RNase fest in der Ribosomen-Struktur verankert sind. Es ist zu erwarten, daß die ribosomale RNase mit der selben Geschwindigkeit synthetisiert wird, mit der die Ribosomen selbst aufgebaut werden. Eine kinetische Studie über die Synthese-Geschwindigkeit der ribosomalen RNase setzt die Isolierung des Enzyms in reiner Form voraus. Mit einem Antiserum gegen das reine Enzym ließe sich seine Entstehung anhand des Einbaus markierter Aminosäuren in das spezifische Immunpräzipitat verfolgen.

Auf diese Weise wurde von Kameyama und Novelli die Biosynthese der ß-Galaktosidase im zellfreien System aus induzierten E.coli-Stämmen untersucht (84). Das Enzym gehört zur Fraktion der in rascher Synthese begriffenen Proteine. Es kann auch in ribosomen-gebundener Form immunologisch nachgewiesen werden (85,86).

Da alle im Zellsaft vorhandenen Proteine an der Oberfläche von Ribosomen synthetisiert werden, müßte mit genügend

empfindlichen Methoden prinzipiell jedes lösliche Enzym in einem ribosomen-gebundenen Durchgangsstadium nachgewiesen werden können. Es ist deshalb wahrscheinlicher, daß ein neuentdecktes "Ribosomen-Enzym" sich in diesem Stadium befindet, als daß es ein integrierender Bestandteil der Ribosomen ist. Letzteres ist auch bezüglich der in E.coli-Ribosomen von Wade und Lovett (87) und in den Ribosomen von Pseudomonas aeruginosa von Campbell et al. (88) nachgewiesenen Polynukleotid-Phosphorylasen noch nicht bewiesen.

So bleibt die ribosomale RNase das einzige bisher bekannte, fest in der Ribosomenstruktur verankerte, latente Enzym.

Die Tatsache, daß die Ribosomen ein Enzym enthalten, das sie unter bestimmten Bedingungen rasch zu zerstören vermag, entzieht sich bisher jeder einleuchtenden Interpretation. Die Vermutungen, die bisher über die Funktion der ribosomalen RNase geäußert wurden, entbehren noch der experimentellen Grundlage. Es erscheint jedoch sinnvoll, eine Reihe von Denkmöglichkeiten aufzuzeigen.

Daß die Struktur eines der Ribosomen-Proteine zufällig das aktive Zentrum einer Ribonuklease enthält, ohne daß diesem Protein irgend eine Bedeutung als Enzym zukommt, ist unwahrscheinlich. Eine solche Vorstellung schafft keinen fruchtbaren Zugang zu dem Problem; bestenfalls verschärft sie die Kritik an jeder positiven Hypothese über die Funktion des Enzyms. Das Vorkommen eines sozusagen "rudimentären" Enzyms in einem an der Protein-Biosynthese beteiligten Partikel widerspräche auch jenem Mindestmaß an teleologischem Denken, das die unausgesprochene Voraussetzung vieler biochemischer Fragestellungen ist.

Am Stoffwechsel der Ribosomen von Bakterien, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, kann das Enzym nicht beteiligt sein. Davern und Meselson zeigten, daß die ribosomale RNS während des exponentiellen Wachstums nicht

abgebaut wird. Die RNS der neusynthetisierten Ribosomen wird ausschließlich aus neuen niedermolekularen Vorstufen aufgebaut (89). Dagegen kommt es bei der Inkubation stationärer Bakterien in magnesiumfreien Puffern oder in Lösungen hoher Natriumchlorid-Konzentrationen zum Abbau des größten Teils der Ribosomen. Im Inkubationsmedium treten große Mengen säurelöslicher Nukleotide auf (31). An diesem schnellen Abbauvorgang ist wahrscheinlich die ribosomale RNase beteiligt, zumal die Bakterien Bedingungen ausgesetzt wurden, unter denen die Ribosomen nicht stabil sind. Beim Übergang von der stationären in die logarithmische Wachstumsphase erhöhen die Bakterien ihren Gehalt an Ribosomen auf das Drei- bis Vierfache (31). Demnach muß auch beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Phase ein schneller Abbau der Ribosomen einsetzen. Diese teilweise Einschmelzung des Proteinsynthese-Apparates dient wahrscheinlich der Anpassung an die Lebensbedingungen im erschöpften Nährmedium. Es ist denkbar, daß die natürliche Funktion der ribosomalen RNase darin besteht, diese Anpassung zu ermöglichen.

Eine solche Erklärung läßt eine Reihe anderer Fragen unbeantwortet: Wie kommt es zur Aktivierung des Enzyms, das doch während der logarithmischen Wachstumsphase in latenter Form vorliegt? Warum ist das Enzym nur in den 30 S-Ribosomen enthalten? Und schließlich: welche Funktion hat das Enzym in den Ribosomen aus Rattenleber?

Ob die ribosomale RNase von Bakterien den Abbau der ribosomalen RNS beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase bewirkt, ließe sich durch Identifizierung der dabei auftretenden Spaltprodukte klären. Auch das Enzym selbst, das normalerweise nicht im Cytoplasma enthalten ist, müßte dort in um so größerer Menge nachweisbar sein, je größer die Abbau-Geschwindigkeit der Ribosomen ist.

Andererseits stehen der Zelle unspezifische Phosphodiesterasen und die Polynukleotid-Phosphorylase zur Verfügung, so daß sehr wahrscheinlich diese Enzyme gemeinsam mit der ribosomalen RNase an der Dezimierung des Ribosomen-Bestandes beteiligt sind.

Eine dritte, oft diskutierte Möglichkeit ist die Beteiligung des Enzyms an der Protein-Biosynthese. Die außerordentlich hohe Umsatzrate der Messenger-RNS könnte dadurch bedingt sein, daß sie bereits in ihrer Bindung an die 70 S-Ribosomen durch das ribosomengebundene Enzym in nicht mehr anlagerungsfähige Bruchstücke gespalten wird. Die 70 S-Ribosomen könnten so in rascher Folge neue Messenger-RNS-Moleküle anlagern. Eine solche Wirkungsweise würde der Latenz der ribosomalen RNase nicht widersprechen, da nur die RNS, die sich in die Struktur der 70 S-Ribosomen einzulagern vermag, mit dem aktiven Zentrum des ribosomengebundenen Enzyms in Berührung käme. Diese enge Verknüpfung der Ribonuklease-Wirkung mit der Biosynthese der Proteine wäre jedoch nur dann sinnvoll, wenn die Messenger-RNS wenigstens für die Zeit stabil erhalten würde, die zum Aufbau einer Polypeptidkette benötigt wird (in vivo wenige Sekunden). Die Anlagerung der Aminoacyl-1-RNS-Moleküle an die ribosomengebundene Messenger-RNS und die Verknüpfung der Aminosäure-Reste zu Proteinen könnten selbst die Vorgänge sein, die die Messenger-RNS dem Zugriff der ribosomalen RNase entziehen.

Diese Hypothese ließe sich am besten dadurch prüfen, daß man die Stabilität von RNS in Bindung an 70 S-Ribosomen mit derjenigen von RNS in Gegenwart von 30 S- und 50 S-Ribosomen vergleicht. Leider stößt die Isolierung von Messenger-RNS immer noch auf große experimentelle Schwierigkeiten. Ferner liegt noch keine Untersuchung darüber vor, ob in einer der Ribosomen-Sorten aus Retikulocyten eine RNase enthalten ist. In dem Protein-Biosynthese-System aus Säugetier-Retikulocyten scheint nämlich die Messenger-RNS stabil zu sein (27). In der ausführlichen Arbeit von Ts'o über die Ribosomen aus Retikulocyten vom

Menschen, Kaninchen und Schaf (90) finden sich keine Anzeichen dafür, daß es in Abwesenheit von Magnesium und bei geringer Ionenstärke zum Abbau der ribosomalen RNS kommt. -

Unter den niedermolekularen Bestandteilen der Ribosomen sind die drei homologen Diamine - Tri-, Tetra- und Pentamethylendiamin - von besonderem Interesse. Biogene Amine wurden wiederholt im Zusammenhang mit Nukleinsäuren beobachtet.

Ames, Dubin und Rosenthal fanden Putrescin und Spermidin im Bakteriophagen T 4 (91). Den Autoren gelang der Nachweis, daß die Amine zusammen mit der Phagen-DNS bei der Infektion der Bakterien injiziert werden. In auffälliger Parallele zu den in Ribosomen herrschenden Mengenverhältnissen, vermögen die Amine in T 4-Phagen etwa ein Drittel der DNS zu neutralisieren.

Auch in DNS-Präparationen aus den Zellkernen der Rattenleber wurden biogene Amine gefunden (92); in Rattenleber-Ribosomen konnten Cadaverin und Spermidin nachgewiesen werden (34). S.S. Cohen bestätigte, daß die Ribosomen von E.coli biogene Amine enthalten. Er fand jedoch anstelle von Cadaverin Spermidin (93). Cohen konnte ferner zeigen, daß Spermidin die Ribosomen in Abwesenheit von Magnesium stabil erhält. In Gegenwart von Spermidin kommt es schon bei sehr geringen Magnesium-Konzentrationen zur Aggregation der 30 S- und 50 S-Partikeln zu den 70 S-Ribosomen.

Die Tatsache, daß sowohl die Zersetzung der Ribosomen mit EDTA und Harnstoff als auch die Spaltung von RNS durch freie ribosomale RNase durch biogene Amine gehemmt wird, läßt vermuten, daß die Latenz des Enzyms wenigstens zum Teil auf dem Vorhandensein von Putrescin und Cadaverin in den Ribosomen beruht. Da jedoch auch Magnesium die ribosomale RNase hemmt, und die Ribosomen selbst Magnesiumionen enthalten, ist es denkbar, daß an der Hemmung des Enzyms im Ribosomen-Verband beide Arten von Kationen beteiligt sind. Eine ausgesprochene Schutzwirkung von Spermin gegen den Abbau der RNS in stationären Bakterien bei der Inkubation in

wässrigen Puffern beobachteten Herbst und Doctor an Haemophilus parainfluenzae (94). Das pH-Optimum dieses RNS-Abbaus ist identisch mit dem der ribosomalen RNase von E.coli. Im Sinne einer Stabilisierung der Nukleinsäure durch biogene Amine kann auch der Befund gedeutet werden, daß Spermidin den durch Poly-Uridylsäure katalysierten Einbau von ^{14}C-Phenylalanin in Extrakten aus E. coli wesentlich steigert (95).

So scheint die Bindung relativ hydrophober Kationen die Nukleinsäuren vor dem Abbau durch Nukleasen zu bewahren, und die Ribosomen, die für die Synthese der Proteine in der Zelle von so entscheidender Bedeutung sind, gegen die Einwirkung der endogenen Ribonuklease stabil zu erhalten.

Mit der wachsenden Kompliziertheit der Lebensvorgänge in der Zelle, die sich dem biochemischen Verständnis erschließen, treten Zellbestandteile von höchst komplexer Struktur in den Gesichtskreis des Biochemikers. Die Ribosomen bilden zusammen mit den kleinsten noch funktionsfähigen Untereinheiten der Mitochondrien und Chloroplasten sowie mit den Multienzymkomplexen eine Klasse kleinster Partikeln, die man als "molekulare Zellorganellen" bezeichnen könnte. Das gemeinsame Bauprinzip dieser Zellbestandteile scheint die räumliche Koordinierung funktionell zusammengehöriger Makromoleküle zu sein. Dieses Ordnungsprinzip dient der räumlichen Begünstigung lebenswichtiger Reaktionsketten, deren Ablauf durch eine ausschließlich vom Zufall der Molekül-Zusammenstöße bestimmte Kinetik nicht garantiert wäre.

Zusammenfassung

1. Die Proteine aus den Ribosomen von Escherichia coli B können in zwei Klassen eingeteilt werden:

a) Das ribosomale Strukturprotein, das 80 % der Ribosomen-Proteine umfaßt. Es ist durch seine Schwerlöslichkeit in wässrigen Puffern zwischen pH 3,2 und pH 10 ausgezeichnet. Es enthält einenhohen Prozentsatz an basischen Aminosäuren und neigt stark zur Aggregation. Sein minimales Molekulargewicht ist etwa 6000.

b) Die löslichen Ribosomen-Proteine. Zu dieser Fraktion gehört der größte Teil der in Synthese befindlichen Proteine und die ribosomale Ribonuklease. Etwa die Hälfte der Proteine dieser Fraktion ist in destilliertem Wasser unlöslich. Der wasserlösliche Anteil zeigt einen besonders hohen Gehalt an basischen Aminosäuren.

2. Die ribosomale RNase kann durch Ammonsulfat-Fraktionierung der löslichen Ribosomen-Proteine etwa 150-fach angereichert werden. Das Enzym vermag im Gegensatz zur pankreatischen RNase alle Internukleotidbindungen zu spalten. Als Endprodukte der RNS-Spaltung treten die cyclischen 2',3'-Nukleosidmonophosphate auf.

Der zeitliche Verlauf der Viskositätsabnahme während der Spaltung hochmolekularer RNS, sowie das niedere Molekulargewicht und die Heterogenität der Spaltprodukte nach kurzzeitiger Einwirkung des Enzyms beweisen, daß die ribosomale RNase die RNS nicht nach einem rein exonukleatischen Mechanismus spaltet. Lösliche RNS wird langsamer gespalten als hochmolekulare. Harnstoff und andere Wasserstoffbrückensprenger beschleunigen die Spaltung der RNS durch ribosomale RNase; hohe Konzentrationen an biogenen Aminen verzögern sie, besonders in der Nähe des pH-Optimum (pH 8,0).

Freie S-H-Gruppen sind nicht am aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt, obwohl es sich gegen Oxydationsmittel als empfindlich erweist. Mit saurer Tonerde (Frankonit) wird es durch quantitative Adsorption vollständig gehemmt. Das Enzym reagiert weder mit einem Kaninchen-Antiserum gegen pankreatische RNase noch mit einem solchen gegen Ribosomen. Beide Seren sind auch ohne Einfluß auf die Aktivität.

Das Enzym ist in den 30 S-Ribosomen lokalisiert.

Die sogenannte ribosomale Phosphatase ist in reinsten Ribosomen nur in Spuren enthalten und kann deshalb nicht in dem selben Sinn als Bestandteil der Ribosomen angesehen werden, wie die ribosomale RNase.

3. Unter den niedermolekularen Bestandteilen der Ribosomen zeichnen sich die biogenen Amine Putrescin und Cadaverin dadurch aus, daß sie in unverminderter Menge auch in den reinsten Ribosomen nachzuweisen sind. Ihre basischen Aminogruppen neutralisieren etwa ein Drittel der ribosomalen Ribonukleinsäure.

Zu den Bestandteilen, deren Menge sich bei wiederholter Reinigung der Ribosomen vermindert, gehören einige Aminosäuren. In sehr geringer Menge sind Lysin, Arginin und Histidin auch in den reinsten Ribosomen enthalten. Die Ribosomen enthalten auch eine Anzahl von Substanzen mit hoher UV-Extinktion, deren elektrophoretisches Verhalten dem der Nukleoside und der heterocyclischen Basen ähnelt.

Eine in der Elektrophorese bei pH 3,2 anodisch wandernde, adeninhaltige Substanz ist mit Methanol aus reinsten Ribosomen extrahierbar.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Gewinnung und Reinigung der Ribosomen aus Escherichia coli B.

Die Bakterien werden in einer belüfteten Nährbouillon bei 37° C gezüchtet, gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit Puffer bei 0° C aufbewahrt.

Zur Homogenisierung suspendiert man 1 Volumen Bakterien-Sediment in 2 Volumen eines Puffers folgender Zusammensetzung:

0,01 m Tris-Succinat,
0,022 m Kaliumchlorid,
0,01 m Magnesiumacetat; pH 7,3.

In diesem Medium liegen die Ribosomen als 70 S-Partikel vor. Ein Vol. der Bakterien-Suspension wird mit 1,5 Vol. Glasperlen (trocken abzumessen) von 0,1 mm Durchmesser vermischt und in einem Vibrationshomogenisator (96) 10 Minuten bei 3500 - 4000 UPM unter Kühlung mit Eiswasser homogenisiert. Man trennt das zellfreie Homogenat von den Glasperlen durch Absaugen auf einer G 2-Fritte und wäscht die Glasperlen ebenso, nachdem man sie in 1 Vol. Puffer resuspendiert hat.

Zur Fraktionierung der Zellbestandteile bedient man sich der differentiellen hochtourigen Zentrifugation. In 45 Min. bei 20 000 UPM sedimentieren die grobpartikulären Zellbestandteile, die Zellwandbruchstücke sowie ein geringer Rest nicht zerschlagener Bakterien. Aus dem Überstand dieser Zentrifugation, dessen hohe Viskosität von seinem Gehalt an DNS herrührt, werden die Ribosomen durch 8 bis 12-stündige Zentrifugation bei 30 000 UPM sedimentiert. Das Sediment besteht aus zwei Schichten: die untere, honigfarbene enthält die Ribosomen, die hellere obere hat gallertige Konsistenz und besteht hauptsächlich aus DNS.

Die in sich zusammenhängende DNS-Schicht kann zum größten Teil mit einem Spatel entfernt werden. 100 g Bakteriensediment ergeben auf diese Weise 6 bis 8 g eines rohen Ribosomensediments. Um anhaftende Verunreinigungen zu entfernen, die aus dem Überstand und aus der darüberliegenden DNS-Schicht mitgeschleppt werden, läßt man die Ribosomen etwa eine Stunde im Puffer quellen, verteilt sie dann vorsichtig mit einem Spatel und homogenisiert schließlich unter Eiskühlung mit einem Potter-Homogenisator. Das Volumen soll das 20- bis 30-fache des Ribosomenvolumens betragen. Die Rückgewinnung geschieht wieder durch Zentrifugation bei 30 000 UPM wozu nunmehr, je nach der Konzentration der Ribosomen, 5 bis 8 Stunden ausreichen, da die DNS entfernt wurde.

Die Reinigung der Ribosomen wurde nach vier verschiedenen Methoden vorgenommen:

a. Dialyse gegen Tris-Puffer und zweimalige Zentrifugation aus einem größeren Volumen dieses Puffers.
b. Zentrifugation durch Saccharose-Lösungen.
c. Zentrifugation aus desoxycholathaltigen Lösungen.
d. Reinigung mit halogenierten Kohlenwasserstoffen (Arcton, Frigen).

Zu a. Das rohe Ribosomensediment wurde in 0,01 m Tris-Puffer pH 7,3 suspendiert. Die Magnesium-Konzentration betrug 0,01 m, wenn 70 S-Ribosomen präpariert werden sollten; und 0,0001 m zur Gewinnung des Gemisches der 30 S + 50 S-Ribosomen. Die gleichen Puffer wurden jeweils zur Dialyse verwendet. Die Zentrifugationsbedingungen waren bei 70 S-Ribosomen: 4 bis 5 Stunden, 30 000 UPM; für 30 S + 50 S-Ribosomen: 8 bis 10 Stunden, 30 000 UPM.

Zu b. In die Zentrifugenbecher (Spinco-Rotor Nr. 30) wurden je 28 ml einer 20%igen Saccharose-Lösung in einem Tris-Puffer eingefüllt, dessen Magnesium-Konzentration der jeweils zu gewinnenden Ribosomensorte angepaßt war. Mit einer Injektionsspritze wurden je 1,5 bis 2,0 ml Ribosomen-Suspension über die Saccharose-Lösung

geschichtet. Die Ribosomen-Konzentrationen lagen zwischen 20 und 40 mg/ml. Bei höherer Konzentration wurde 30%ige Saccharose verwendet. Die Zentrifugationsbedingungen waren bei 70 S-Ribosomen: 6 bis 8 Stunden, 30 000 UPM; bei den 30 S + 50 S-Partikeln: 10 bis 12 Stunden, 30 000 UPM. Durch eine Waschzentrifugation aus einem großen Volumen reinen Tris-Puffers wurde der größte Teil der im Ribosomen-Sediment enthaltenen Saccharose entfernt.

Zu c. Ribosomen wurden nach a oder b vorgereinigt und in Tris-Magnesium-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen einer 0,6%igen Natriumdesoxycholat-Lösung pH 7,8 versetzt und 30 Min. bei 0° C stehengelassen. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Ribosomen nochmals in einer großen Menge Puffer gelöst und zentrifugiert. Das Ribosomen-Sediment war farblos; das 260/280-Verhältnis betrug 2,02.

Zu d. 30 ml einer Lösung von nach a gewaschenen 70 S-Ribosomen wurden mit 15 ml Frigen 113 versetzt und 1 Stunde bei 0° C kräftig magnetisch gerührt. Zur Trennung der Phasen wurde anschließend 15 Min. bei 10 000 UPM zentrifugiert. An der Phasengrenze bildete sich dabei eine Schicht denaturierten Proteins. Aus der vorsichtig abpipettierten wässrigen Oberphase wurden die Ribosomen durch 2-stündige Zentrifugation bei 40 000 UPM zurückgewonnen. Zur vollständigen Entfernung des Frigens wurden die Partikeln nochmals durch Zentrifugation aus einem größeren Volumen Puffer gewaschen. Das 260/280-Verhältnis dieser Ribosomen war 1,99.

Chromatographie an Sephadex G 75.

3 ml einer Lösung unreiner Ribosomen in 0,05 m Tris-Sulfat, 0,01 m Magnesiumsulfat pH 7,2 wurden auf einer Säule (22 x 2 cm) aus Sephadex G 75 im gleichen Medium chromatographiert. Die aufgetragene Gesamtextinktion bei 260 m betrug 918,0. Es wurden 36 Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen.

Die Ribosomen wanderten mit der Front des Elutionsmittels. Der DNS-Gehalt der vereinigten Fraktionen des ersten Gipfels betrug 97 γ/ml; das sind 64 % des DNS-Gehaltes der entsprechend verdünnten Ausgangslösung (152 γ/ml). Demnach ist diese Methode nicht geeignet, Ribosomen von DNS zu befreien.

2. Spaltung von Ribosomen

a. Mit EDTA und Harnstoff:

Lösungen von Ribosomen in 0,01 m Tris-Succinat-, 0,0001 m Magnesiumacetat-Puffer pH 7,3 wurden mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 2 m Harnstoff und 0,01 m EDTA versetzt und so lange bei 37° C aufbewahrt, bis sich ein flockiger Niederschlag von ribosomalem Strukturprotein gebildet hatte. Nach einer Zentrifugation (10 Minuten bei 15 000 UPM im Spinco-Rotor 40) wurde der Niederschlag mit einem kleinen Volumen Puffer gewaschen und nochmals scharf zentrifugiert. Wenn sich bei einer weiteren halbstündigen Inkubation der vereinigten Überstände keine erneute Trübung von ribosomalem Strukturprotein bildete, wurden diese gegen 0,01 m Tris-Chlorid oder gegen 0,01 m Phosphat pH 7,5 dialysiert.

Durch Erhöhung der Harnstoff- und der EDTA-Konzentration ließ sich die Zersetzung der Ribosomen wesentlich beschleunigen. Jedoch erforderte in diesem Falle die vollständige Entfernung der Spaltungsagentien sehr lange Dialysezeiten.

Zur Registrierung des zeitlichen Verlaufes der Zersetzung der Ribosomen mit Harnstoff und EDTA wurden dem Inkubationsgemisch nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen, deren Gehalt an säurelöslichen RNS-Spaltprodukten durch Extinktionsmessung bei 260 mμ bestimmt wurde (Abb. 26).

Zu diesem Zweck wurden 0,2 ml-Proben in 0,8 ml eiskalten Wassers einpipettiert und das Gemisch mit 4 ml kalter

0,3 n Perchlorsäure versetzt. Auf diese Weise wurde eine feinflockigere Fällung erhalten als bei der Vereinigung der 0,2 ml-Probe mit 4,8 ml Perchlorsäure.

Auf Grund der Schwerlöslichkeit des ribosomalen Strukturproteins konnte die Ribosomenzersetzung auch nephelometrisch verfolgt werden. In diesem Falle wurde die Zersetzung in der Küvette bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Zunahme der Trübung zeigt den gleichen für den autokatalytischen Zerfall der Ribosomen charakteristischen Verlauf wie die Extinktionszunahme in Abb. 26.

Die so erhaltenen Präparationen der löslichen Ribosomenproteine stellten zugleich die erste Anreicherungsstufe der ribosomalen RNase dar und wurden als E 1 bezeichnet.

Zur vollständigen Reinigung des ribosomalen Strukturproteins von adsorbierten löslichen Proteinen und Nukleotiden wurden die Niederschläge zehnmal mit kalter 0,9%iger Kochsalz-Lösung gewaschen und anschließend mit Alkohol und Äther zur Trockene gebracht. Für die Aminosäure-Analyse wurde das Strukturprotein aus 8 m Harnstoff durch Eingießen in ein großes Volumen 0,9%ige Kochsalz-Lösung umgefällt. Die mit Harnstoff und EDTA präparierten unlöslichen Ribosomenproteine wurden als "S-Protein" (von Strukturprotein) bezeichnet.

b. Mit Phenol:
Ribosomen-Lösungen wurden zweimal je 10 Minuten mit dem gleichen Volumen 80%igen wässrigen Phenols in der Kälte geschüttelt. Das denaturierte Protein schied sich hierbei als voluminöse Zwischenphase ab. Die Phasentrennung und die Sedimentation des Zwischenphasenproteins ("Z-Protein") wurde durch hochtourige Zentrifugation (30 000 UPM, 15 Minuten) herbeigeführt. Das Sediment wurde dreimal mit 6%igem Phenol und anschließend fünfmal mit Äthanol gewaschen. Ein Trockenpulver wurde durch Waschen mit Äther erhalten.

Zur Gewinnung der hochmolekularen ribosomalen RNS werden Ribosomen-Lösungen zweimal 30 Minuten mit dem gleichen Volumen 80%igem Phenol bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach Phasentrennung und Sedimentation des Z-Proteins durch hochtouriges Zentrifugieren (30 000 UPM, 30 Min.) fällt man die RNS durch Hinzufügen von 1 Vol. 2 m Natriumchlorid zur wässrigen Phase. Die Fällung wird mindestens einmal wiederholt. Lösungen der RNS in geeigneten Puffern werden durch Dialyse hergestellt. Soll eine Alkohol-Fällung angeschlossen werden, so dialysiert man zunächst erschöpfend gegen Wasser, bis im Außenmedium kein Chlorid mehr nachweisbar ist.

3. Extraktion von Ribosomen

1 bis 5 g Ribosomen-Sediment wurden mit 10-20 ml Extraktionsmittel (80%iges Methanol) bzw. Ameisensäure-Essigsäure-Puffer pH 1,9) versetzt und eine Minute mit Hilfe des hochtourigen Ultrathurrax-Homogenisators suspendiert. Diese Methode wurde gewählt, um die Ribosomen möglichst kurze Zeit dem Extraktionsmittel auszusetzen und eine Selbstzersetzung durch Aktivierung der ribosomalen RNase zu vermeiden. Um aus den milchigen Suspensionen einen klaren Extrakt zu erhalten, war häufig hochtourige Zentrifugation notwendig. Die Extrakte wurden bei 25-35° C am Rotationsverdampfer eingedampft und zur Elektrophorese in den jeweils geeigneten Puffern aufgenommen.

4. Anreicherung der ribosomalen RNase

a. Der enzymatische Test.
Die Standard-Testansätze enthielten:
5 mg RNS in 1 ml neutralen Puffers geringer Ionenstärke (0,01 m Natriumphosphat, 0,01 m Tris-Acetat);
je nach Aktivität der verwendeten Enzympräparationen
0,1 ml oder 0,2 ml Enzymlösung, und
0,9 ml bzw. 0,8 ml Puffer oder anderweitige Zusätze, deren

Wirkung untersucht werden sollte.
Häufig wurde die RNS in 1,6 m Harnstoff gelöst, so daß der 2 ml-Testansatz eine Harnstoffkonzentration von 0,8 ml/l hatte.
Die genannten Bestandteile des Testansatzes wurden bei 0^{o} C vereinigt. Der Blindwert wurde unmittelbar nach Hinzufügen des auf 2 ml ergänzenden Zusatzes mit 8 ml kalter 0,3 n Perchlorsäure versetzt. Ebenso wurde die Reaktion in den anderen Proben nach verschiedenen Inkubationszeiten unterbrochen. Die Inkubationen erfolgten zur Aktivitätsbestimmung bei 37^{o} C. Die entstandenensäurelöslichen Spaltprodukte der RNS wurden durch Extinktionsmessung bei 260 mμ bestimmt. Die Reaktion verlief unter diesen Bedingungen mindestens 15 Min. linear (Abb. 33).

Als willkürliche Aktivitätseinheit wurde die Zunahme der Extinktion bei 260 mμ um 0,1 in einer Minute bei 37^{o} C unter Standard-Bedingungen gewählt.

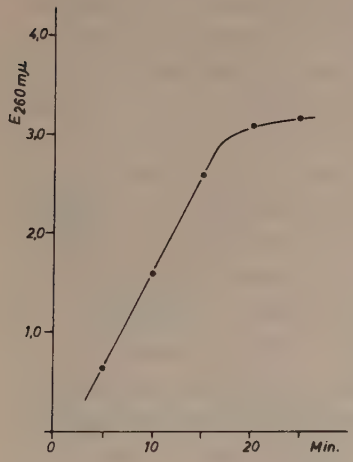


Abb. 33.
Inkubation von ribosomaler RNS mit ribosomaler RNase unter Standard-Bedingungen: 37^{o} C, 0,8 m Harnstoff, pH 7,2. Proteinmenge: 0,05 mg; RNS-Konzentration: 2,5 mg/ml.

Als Substrat wurde entweder hochmolekulare RNS aus Ribosomen von E.coli oder Hefe-RNS verwendet. Letztere wurde aus den Rückständen der Hefe-L-RNS-Präparation nach P. Zamecnik (97) folgendermaßen gewonnen:

Ein von Zelltrümmern durch Zentrifugation befreiter Extrakt wurde in der Kälte mit Natriumchlorid versetzt, bis die Konzentration 1 mol/l betrug. Hierbei bildete sich ein voluminöses Sediment, das in Wasser gelöst wurde. Nach Entfernen der Trübung durch Zentrifugation wurde die Natriumchlorid-Fällung wiederholt. Nach einer weiteren NaCl-Fällung und einer Alkohol-Fällung wurde die RNS zur Entfernung von Polysacchariden der Reinigungsmethode von Kirby (98) unterworfen.
Der auf ein Grammatom Phosphor bezogene Extinktions-Koeffizient dieser RNS betrug P = 8160; die spezifische Extinktion war: 21,4 cm^2/mg.

b. Anreicherung des Enzyms durch Ammonsulfat-Fällung.
Vorversuche wurden bei 0^o C mit kaltgesättigter Ammonsulfat-Lösung durchgeführt. Die Sedimente wurden bei 10 000 UPM abzentrifugiert, in einem kleinen Volumen 0,01 m Tris-Acetat pH 7 gelöst und nach der Dialyse auf ihre RNase-Aktivität hin untersucht.
Zur Anreicherung des Enzyms wurden E 1-Lösungen mit einer Protein-Konzentration von 2 bis 3 mg/ml in der Kälte unter Rühren langsam mit feinpulvrigem Ammonsulfat versetzt, bis 60 % der Sättigungskonzentration erreicht waren. Nach einstündigem Stehen in der Kälte wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu 80%iger Sättigung mit Ammonsulfat versetzt, das Präzipitat nach einer Stunde abzentrifugiert und in einem kleinen Volumen 0,01 m Tris-Acetat-Puffer pH 7,2 gelöst. Nach erschöpfender Dialyse gegen den selben Puffer wurden Volumen, Proteinkonzentration und RNase-Aktivität bestimmt.

c. Säulenchromatographische Reinigung.
1. Carboxymethyl-Cellulose wurde mit 0,5 m Natriumbicarbonat auf die Natrium-Form gebracht und anschließend mit 0,05 m Natriumphosphatpuffer pH 7,0 neutralgewaschen. 4,5 ml einer E 1-Präparation, entsprechend einer Gesamtextinktion von 8,78 wurden auf eine 2,8 mal 22 cm-Säule aufge-

tragen und in einem Salzgradienten in der Kälte chromatographiert. Im Mischgefäß befanden sich 200 ml 0,05 m Natriumphosphat-Puffer pH 7,0; der Gradient wurde mit 1 n Natriumchlorid, gelöst im gleichen Puffer, hergestellt. Das Volumen der Fraktionen betrug 5 ml, die Laufgeschwindigkeit 1,5 bis 2 Fraktionen pro Stunde. In den Fraktionen 9 bis 47 waren 71 % der aufgetragenen 280 mμ-Extinktion enthalten. Der Protein-Gipfel enthielt 65 % der aufgetragenen Aktivität.

Mit Hilfe des in den Fraktionen 20 bis 28 enthaltenen Enzyms wurde der Vorversuch zur Thermostabilität der ribosomalen RNase durchgeführt.

2. DEAE-Cellulose wurde mit primärem Ammoniumphosphat auf die Phosphatform gebracht und anschließend solange mit Wasser gewaschen, bis die Waschflüssigkeit nicht mehr mit Neßler's Reagenz reagiert. Der Austauscher wurde schließlich mit einem großen Volumen 0,005 m Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 äquilibriert.

Auf eine Säule (2 mal 27 cm) wurden 4 ml einer nicht dialysierten Präparation des löslichen Ribosomen-Proteins pipettiert. Zur Elution diente ein Salz- und pH-Gradient. Ausgangspuffer: 0,005 m Natriumphosphat pH 7,2; Puffer zur Erzeugung der Gradienten: 0,1 m Natriumdihydrogenphosphat pH 4,3. Die Gipfel wurden durch Extinktionsmessung bei 260 mμ und bei 280 mμ lokalisiert. Gipfel, deren 260/280-Verhältnis kleiner als 1,6 war, wurden auf RNase-Aktivität geprüft (Abb. 33). Aus Abbildung 34 ist die hohe RNase-Aktivität des ersten Gipfels zu entnehmen.

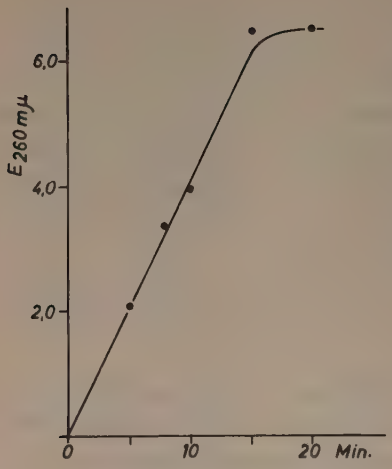


Abb. 34.
RNase-Aktivität im ersten Gipfel des DEAE-Chromatogramms. Die Test-Ansätze enthielten:
1,0 ml RNS = 5 mg, in 0,05 m Tris-Chlorid-Puffer pH 7,5,
0,5 ml Enzym = 76 γ Protein,
0,5 ml 8 m Harnstoff. Inkubationstemperatur: 37° C.

d. Methodisches zu den Inkubationsversuchen mit ribosomaler RNase in Gegenwart verschiedener Agenzien und Substrate.

1. Für den Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeiten von hochmolekularer RNS und l-RNS wurden Substratlösungen gleicher Extinktion bei 260 mμverwendet. Die Hefe-l-RNS stellte freundlicherweise Herr Dr. Zachau zur Verfügung, der sie nach der Methode von Zamecnik (97) gewonnen hatte.
2. Der Einfluß der 5'-Phosphat-Endgruppe auf die Spaltungsgeschwindigkeit von Hefe-l-RNS mit ribosomaler RNase wurde folgendermaßen geprüft: 30 mg Hefe-l-RNS, gelöst in 2 ml 0,2 m Natriumacetat-Puffer pH 5,2, wurden mit 0,5 ml Prostataphosphomonoesterase versetzt und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Kontrollexperimente zeigten, daß ein Fünftel dieser Enzymmenge 1 mg Adenylsäure in 20 Min. vollständig spaltete. Zum Vergleich wurden 30 mg l-RNS in 2,5 ml Puffer eine Stunde bei 37° C inkubiert. Beide Proben wurden anschließend in der Kälte mit 6 ml kaltem Äthanol gefällt und die Niederschläge mit Äthanol und Äther zur Trockene gebracht.
Zur anschließenden Behandlung mit ribosomaler RNase wurden die Niederschläge in je 2 ml 0,01 m Trisacetat-Puffer

pH 7,1 gelöst und in der Kälte mit 0,1 ml E 2 versetzt. Unmittelbar nach Hinzufügen des Enzyms wurden 0,2 ml entnommen und in 0,8 ml einer Carrier-RNS-Lösung pipettiert, die 1 mg RNS/ml enthielt. Das Substrat wurde gemeinsam mit der Carrier-RNS mit 4 ml 0,3 n Perchlorsäure ausgefällt. Ebenso wurde mit den nach verschiedenen Zeiten der Inkubation bei 37° C entnommenen 0,2 ml-Proben verfahren. Für die Messung der 260 mμ-Extinktion diente jeweils die zu Beginn in der Kälte entnommene Probe als Blindwert.

3. Inaktivierung der ribosomalen RNase mit Chinon.
1 ml einer E 1-Lösung (1,2 mg Protein/ml) wurde bei 0° C mit 1 ml einer 0,01m Lösung von Benzochinon in 0,05 m Phosphatpuffer pH 6,6 versetzt. Unmittelbar nach dem Vereinigen der Lösungen wurden 0,1 ml des Gemisches zur Messung der RNase-Aktivität dem Standard-Testansatz zugefügt.und dieser 8 Minuten bei 37° C inkubiert. Ebensolche Probenentnahmen und Aktivitätsmessungen erfolgten nach 20, 40, 60 und 80 Minunten Inkubation bei 37° C. Zur Kontrolle wurde das Gemisch aus 1 ml Enzym-Lösung und 1 ml Phosphatpuffer ebenfalls bei 37° C inkubiert und seine Aktivität am Beginn, nach 60 und nach 90 Minuten gemessen. Die Extinktionen wurden jeweils gegen nicht inkubierte Testansätze mit Enzym-Chinon-Gemisch (0,1 ml) bzw. Kontroll-Enzym (0,1 ml) gemessen.
4. Die Wirkung von N-Äthylmaleimid auf ribosomale RNase wurde folgendermaßen untersucht:
Das Inkubationsgemisch hatte vor dem Zusatz von N-Äthylmaleimid folgende Zusammensetzung:
10 mg Hefe-RNS, gelöst in 2 ml Wasser;
0,1 ml E 2 in physiologischer Kochsalzlösung, und
1,9 ml 0,05 m Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0.
Aus diesem Gemisch wurden vor der Inkubation 0,2 ml entnommen und in 0,8 ml Carrier-RNS-Lösung (1 mg/ml) in der Kälte pipettiert. Die Fällung wurde mit 4 ml 0,3 n Perchlorsäure vorgenommen. Während der Inkubation bei

30° C wurden in der gleichen Weise Proben nach 4, 8, 12 und 16 Min. entnommen und gefällt. Nach 18 Min. erfolgte der Zusatz von 1 ml 0,04 m N-Äthylmaleimid, gelöst in Phosphatpuffer. Die nächsten Proben wurden nach 20, 24, 28, 32, 36 und 40 Min. entnommen. Die Extinktionen bei 260 mμ wurden gegen die in der Kälte zu Beginn entnommene Probe gemessen. Die durch den Zusatz des N-Äthylmaleimids entstandene Volumensänderung wurde durch Multiplikation der Meßwerte mit dem Volumenverhältnis korrigiert.

5. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

a. Lösungen von 30 S + 50 S-Ribosomen in 0,01 m Tris-Succinat-Puffer pH 7,3, 10^{-4} m Magnesiumacetat, wurden mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 0,01 mol/l EDTA und 2 mol/l Harnstoff versetzt und bei 37° C inkubiert, bis sich ein flockiger Niederschlag von ribosomalem Strukturprotein gebildet hatte. Die Suspension wurde 10 Min. bei 15 000 UPM (Rotor 40, Spinco) zentrifugiert, das Sediment im halben Volumen 0,2 m Natriumacetat-Puffer pH 5,2 resuspendiert und ebenso zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden einer erschöpfenden Dialyse gegen 0,2 m Natriumacetat pH 5,2 unterworfen.

b. Zur Messung der Phosphatase-Aktivität wurden jeweils 0,5 ml Enzymlösung mit 0,5 ml einer 0,02 molaren Lösung von p-Nitrophenylphosphat bei 0° C versetzt und zusammen mit Blindwerten aus 0,5 ml Natriumacetatpuffer pH 5,2 und 0,5 ml Substrat verschiedene Zeiten bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad durch Hinzufügen von 4 ml kalter 0,1 n Natronlauge unterbrochen und die Extinktion des entstandenen p-Nitrophenolatanions bei 400 mμ gemessen. Als willkürliches Maß der Phosphatase-Aktivität diente die Extinktion pro Minute unter den angegebenen Bedingungen.

c. Zur Bestimmung des Phosphatase-Gehaltes von Ribosomen verschiedenen Reinheitsgrades wurden E 1-Präparationen aus je-

weils einer definierten Menge der Ribosomen gewonnen und die Gesamtaktivität durch die Extinktion der eingesetzten Ribosomen dividiert. Aus Tabelle 8 geht die Berechnung der auf Seite 55 angeführten Zahlenwerte hervor.

Tab. 8.

Berechnung der auf die Ribosomen-Extinktion bezogenen Phosphatase-Gehalte von Ribosomen verschiedenen Reinheitsgrades.

Aktivität in 0,5 ml E 1	Volumen von E 1	Ges.-Aktivität	Einges. Extinktion der Ribosomen	Ges.-Aktivität bezogen auf Ribosomen-Extinktion
a. 0,1883	7,8	2,94	1475	$2,0 \times 10^{-3}$
b. 0,036	13,5	0,972	1551	$6,3 \times 10^{-4}$
c. 0,023	7,8	0,371	568	$6,5 \times 10^{-4}$
d. 0,00067	7,6	0,0102	249	$0,41 \times 10^{-4}$

Die verschiedenen E 1-Präparationen wurden gewonnen aus:

a. mit Tris-Puffer,

b. mit Saccharose,

c. mit Arcton und

d. mit Natriumdesoxycholat gewaschenen Ribosomen.

6. Lokalisierung der ribosomalen RNase in den 30 S-Ribosomen.

a. Eine kleine Menge über Saccharose gewaschener Ribosomen (siehe 1b) wurde in 5 ml 0,01 m Tris-Succinat, 0,022 m KCl, 0,0001 m Magnesiumacetat, pH 7,3 gelöst und 8 Stunden gegen insgesamt 1 Liter dieses Puffers dialysiert. Eine Überprüfung in der analytischen Ultrazentrifuge ergab, daß alle 70 S-Ribosomen in 30 S + 50 S-Partikel dissoziiert waren. Teilchen mit kleinerer Sedimentationskonstante traten im Sedimentationsbild nicht auf. Die Ribosomenlösung wurde durch Verdünnung auf eine Ribosomen-Konzentration von etwa 6 mg/ml gebracht. Mit höheren Ribosomen-Konzentrationen

(9 bis 10 mg/ml) wurden unscharfe Banden erhalten. Die Dichte der überschichteten Ribosomenlösung sollte wesentlich geringer sein als die Dichte 5%iger Saccharose-Lösung.

Die 30 S- und 50 S-Ribosomen wurden durch Zentrifugation über einen Saccharose-Gradienten im Rotor SW 25 getrennt (32). Der Gradient wurde in den drei Zentrifugenbechern dieses Rotors durch kontinuierliches Vermischen und Überschichten von je 13,5 ml 30%iger und 13,5 ml 5%iger Saccharose hergestellt. Beide Zuckerlösungen waren 0,0001 molar an Magnesiumacetat. Je 1,2 ml der Ribosomenlösung wurden mit einer Injektionsspritze über die Saccharose-Lösungen geschichtet. Nach sechsstündiger Zentrifugation bei 25 000 UPM wurde eine kleine Kanüle durch den Boden der Zentrifugenbecher gestoßen und 50 Fraktionen zu je 24 Tropfen aus jedem Becher gesammelt. Die Ribosomenbanden wurden vorher durch seitliche Beleuchtung der Röhrchen aus einem schmalen Spalt sichtbar gemacht, um die erreichte Trennung zu überprüfen.

Die Extinktion bei 260 mμ wurde an verdünnten Aliquoten aus den Fraktionen gemessen (Abb. 18, S. 42).

b. Zur Messung der RNase-Aktivität in den beiden Ribosomenbanden wurden den 50 Fraktionen eines Zentrifugenbechers je 5 mg Hefe-RNS- gelöst in 0,5 ml Tris-Puffer - und 1 ml Zersetzungspuffer - 2 m Harnstoff, 0,01 m EDTA, pH 6,9, - in der Kälte zugesetzt. Alle Fraktionen wurden - jeweils 10 gleichzeitig - 8 Min. bei 37° C inkubiert und danach mit 8 ml kalter 0,3 n Perchlorsäure versetzt und in der Kälte zentrifugiert. Für die Messung der Extinktion bei 260 mμ in den Überständen wurde die erste Fraktion als Blindwert benützt.

Einen Versuch mit einer zu großen Ribosomenmenge und zu kurzer Zentrifugationszeit zeigt die Abbildung 35. Die Fraktionen wurden ohne Zusatz von Substrat-RNS 20 Min. bei 37° C mit dem Zersetzungspuffer (2 m Harn-

stoff, 0,01 m EDTA) inkubiert. Die Gipfel waren in Richtung höherer Dichten unscharf. Man erkennt lediglich an der zu geringen Hypochromie im 50 S-Gipfel, daß hier die Zersetzung nicht vollständig verlaufen sein kann:

Hypochromie im 50 S-Gipfel: 13,5 %
Hypochromie im 30 S-Gipfel: 25,8 %

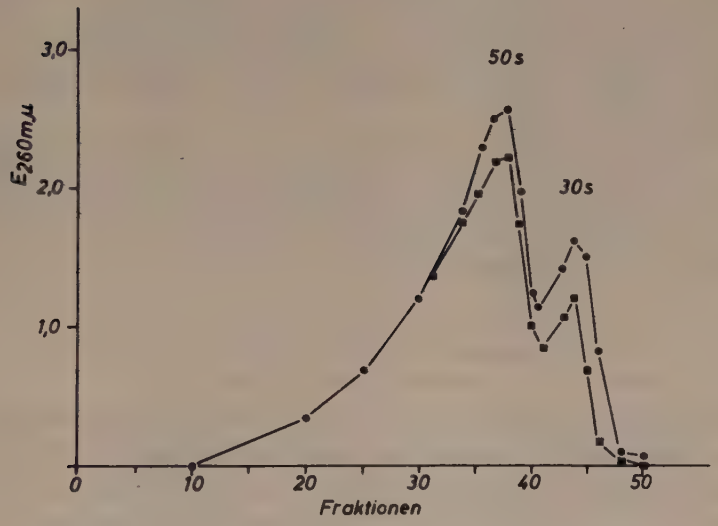


Abb. 35. Unvollständige Trennung von 30 S- und 50 S-Ribosomen durch Zentrifugation im Saccharose-Gradient mit einer zu großen Ausgangsmenge und zu kurzer Zentrifugationszeit.

■———■ : Extinktion der nicht inkubierten Fraktionen bei 260 mμ.
●———● : Fraktionen 20 Min. bei 37° C mit 2 m Harnstoff und 0,01 m EDTA inkubiert, mit 5 ml 0,3 n Perchlorsäure versetzt und zentrifugiert; Extinktionen der Überstände bei 260 mμ.

c. Der Versuch, die sogen. ribosomale Phosphatase in einer der beiden Partikel-Sorten zu lokalisieren, wurde folgendermaßen durchgeführt:

Den Fraktionen aus einem Zentrifugenbecher wurde je 1 ml einer 0,01 m Lösung von p-Nitrophenylphosphat - gelöst in 0,02 m EDTA, 0,1 m Natriumacetat pH 5,2 - zugesetzt. Nach der Inkubation (30 Min., 37° C) wurde mit 5 ml kalter 0,1 n Natronlauge versetzt und die Extinktion bei 400 mμ gegen die erste Fraktion gemessen.

Die Fraktionen des zweiten Zentrifugenbechers wurden dazu benützt, durch Entnahme von Aliquoten und Extinktionsmessung bei 260 mμ die Gipfel zu lokalisieren. Die Gipfelfraktionen wurden in der oben beschriebenen Weise auf Phosphatase-Aktivität geprüft, mit einer Inkubationszeit von 2 Stunden.

Aus den Gipfelfraktionen vom dritten Zentrifugenbecher wurden zwei gegen 0,2 n Natriumacetat-Puffer dialysierte E 1 - Präparationen hergestellt, die sich ebenfalls als frei von Phosphatase-Aktivität erwiesen.

7. Immunologische Versuche

a. Die Gewinnung eines Antiserums gegen pankreatische RNase erfolgte nach folgendem Immunisierungsplan:
Ein Kaninchen erhielt an jedem Mittwoch, Donnerstag und Freitag von vier aufeinanderfolgenden Wochen je eine intramuskuläre, eine subcutane und eine intravenöse Injektion von 0,3 ml RNase-Lösung in 0,01 m Phosphat-Puffer, pH 7. Die Proben für die intramuskuläre und die subcutane Injektion wurden mit 0,3 ml Aluminiumhydroxyd-cγ-Gel vermischt.
Die tägliche Gesamtdosis wurde von Woche zu Woche folgendermaßen gesteigert:

	Mi, Do, Fr täglich
1. Woche	1,7 mg
2. Woche	3,0 mg
3. Woche	4,0 mg
4. Woche	6,0 mg

Zehn Tage nach der letzten Injektion erhielt das Tier abermals 6 mg Ribonuklease. Die Blutentnahme erfolgte nach einer weiteren Woche. Das Serum wurde in mehreren Proben zu 3 bis 4 ml bei -5° C bis zur Verwendung aufbewahrt.

b. Bestimmung der RNase-Aktivität in Gegenwart des Antiserums.
Zur Ermittlung der geringsten Antigen-Konzentration, bei der noch ein Immunpräzipitat entsteht, wurden Gemische von 0,1 ml RNase-Lösung in 0,9%igem Kochsalz mit 0,5 ml Antiserum eine Stunde bei 37° C inkubiert. Ebenso wurde mit einem Kontrollserum aus dem Blut eines nicht immunisierten Kaninchens verfahren. Die Ablesung erfolgte, nachdem die Proben 24 Stunden bei 4° C gestanden hatten. Für den Aktivitätsvergleich wurden die Gemische von 1,5γ RNase in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 0,5 ml Antiserum bzw. Kontrollserum verwendet, nachdem sie jeweils eine Stunde bei 37° C inkubiert und 4 Stunden bei 4° C aufbewahrt worden waren. 0,1 ml dieser Gemische - entsprechend 0,25 γ RNase - wurden dem Standard-Testansatz zugesetzt. Um den Antigen-Antikörper-Komplex nicht zu zerstören, wurde in diesen Versuchen der Harnstoff weggelassen.
Die Wirkung des Anti-Pankreas-RNase-Serums auf die Aktivität der ribosomalen RNase wurde mit Gemischen aus 0,1 ml einer konzentrierten E 2-Präparation mit 0,5 ml Antiserum bzw. Kontrollserum untersucht. Die Proben wurden ebenfalls eine Stunde bei 37° C inkubiert und vier Stunden bei 4° C aufbewahrt, bevor sie für den enzymatischen Test verwendet wurden (Abb. 27, S. 52).

c. Immunisierung eines Kaninchens gegen Ribosomen.
30 S- + 50 S-Ribosomen wurden zweimal durch Zentrifugation über Saccharose und einmal mit Puffer gewaschen. In vier aufeinanderfolgenden Wochen erhielt ein Kaninchen an je drei Tagen je eine intravenöse Injektion von 2 mg Ribosomen in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung und eine

intramuskuläre Injektion von 1 mg Ribosomen in 1 ml Kochsalz + 0,5 ml Aluminiumhydroxyd-cγ-Gel. Zehn Tage nach der letzten Injektion wurde nochmals die gleiche Dosis gegeben und nach weiteren zehn Tagen 35 ml Blut entnommen. Das Serum hatte einen geringen Titer.

Je 0,2 ml der konzentrierten E 2-Präparation wurden mit 0,8 ml dieses Antiserums und mit 0,8 ml Kontrollserum versetzt und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die so behandelten Gemische dienten zum Vergleich der RNase-Aktivität im Standard-Testansatz (Abb. 28, S. 53).

8. Identifizierung der RNS-Spaltprodukte, die bei der Einwirkung von ribosomaler RNase entstehen.

300 mg Ribosomen, gelöst in 1 ml 0,02 m Tris-HCl-Puffer pH 7 wurden mit 1 ml 0,1 m EDTA und 2 ml 4 m Harnstoff versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde das ausgefallene Strukturprotein abzentrifugiert. Aliquote des Überstandes wurden direkt auf die Elektropherogramme aufgetragen.

Für den elektrophoretischen Vergleich mit den Mononukleotiden wurde als Referenz das Gemisch der vier 2'- bzw. 3'-Nukleosidmonophosphate benützt. Zur Umwandlung der cyclischen 2',3'-Pyrimidin-Nukleosidmonophosphate wurde ein Anteil des Überstandes mit 50 γ pankreatischer RNase pro ml 1 Stunde bei 37° C inkubiert.

Die Umwandlung der vier cyclischen 2',3'-Nukleosidmonophosphate in die Nukleosid-2'- bzw. -3'-Phosphate geschah durch Hydrolyse mit 0,3 n Kaliumhydroxyd, 18 Stunden bei 37° C. Die Probe wurde anschließend mit konzentrierter Perchlorsäure in der Kälte auf pH 3,2 gebracht und scharf zentrifugiert. Nach vorsichtigem Eindampfen am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in 0,5 ml 0,05 m Ammoniumformiat-Puffer pH 3,2 aufgenommen und in demselben Puffer der Elektrophorese unterworfen.

Zur Präparation eines Gemisches der vier cyclischen 2',3'-Nukleosidmonophosphate wurde ein Gemisch aus gleichen Mengen 2'- + 3'-Uridylsäure, 2'- + 3'-Adenylsäure, 2'- + 3'-Cytidylsäure und 2'- + 3'-Guanylsäure nach der Methode von Brown et al. (55) mit überschüssigem Trifluoracetanhydrid behandelt. Die Cyclisierung verlief erwartungsgemäß nicht vollständig. Das Präparat erfüllte jedoch den Zweck des papierelektrophoretischen Vergleiches mit den Spaltprodukten der RNS (Abb. 8, S. 30).

Die Identifizierung des adeninhaltigen Spaltproduktes gelang durch Vergleich seines Verhaltens in der Papierelektrophorese mit dem des nach Khorana (57) mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid gewonnenen cyclischen Adenosin-2',3'-monophosphates.

Eine größere Menge des adeninhaltigen Spaltproduktes wurde durch Elution der entsprechenden Bande aus mehreren Pherogrammen vom Überstand des Spaltungsansatzes gewonnen.

Zur Hydrolyse des Spaltproduktes wurde 1 ml eines konzentrierten Eluates mit 1 ml 1 n Kaliumhydroxyd versetzt und 18 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Neutralisation mit konzentrierter Perchlorsäure und Abzentrifugieren des Kaliumperchlorats wurde die Lösung in der Kälte im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd eingeengt. Das konzentrierte Hydrolysat wurde elektrophoretisch bei pH 7,5 und papierchromatographisch in folgenden Systemen auf Adenosin-5'-phosphat geprüft:

a. Isopropanol, konz. Salzsäure, Wasser = 170 : 41 : 39; (99)
b. Tetrafurfurylalkohol, Isoamylalkohol, Kaliumcitrat-Puffer pH 3,0 = 1 : 1 : 1; (100)

jeweils absteigend auf Whatman Nr. 1.
Das Vorhandensein von Muskeladenylsäure im alkalischen Hydrolysat des adeninhaltigen Produktes konnte jedoch erst durch die Anwendung der Perjodat-Reaktion auf dem Papier sicher ausgeschlossen werden (101).

9. Identifizierung der biogenen Amine

Mit Hilfe von Referenzen wurden 1,3-Diaminopropan, Putrescin und Cadaverin zunächst auf kurzzeitigen Pherogrammen bei pH 1,9 in AE-Puffer nachgewiesen. Die Laufzeiten betrugen bei 8000 Volt 10 bis 15 Min. Von den basischen Aminosäuren trennen sich die Amine besonders gut bei pH 3,2. Hier wurden die Laufzeiten in 0,05 m Acetatpuffer bei 6000 Volt auf 30 bis 40 Min. ausgedehnt (siehe Abb. 30, S. 57).

Die papierchromatographische Trennung und Identifizierung der biogenen Amine wurde in dem von Wyatt (99) beschriebenen System Isopropanol : 2 n Salzsäure = 13 : 7 durchgeführt. In dem gleichen System wurden die Bisdinitrophenyl-Derivate der aus Ribosomen isolierten Amine mit denen authentischer Präparate verglichen. Die Umsetzung der Amine mit Fluordinitrobenzol wurde in Gegenwart von 10%igem Natriumbicarbonat nach der üblichen Methode (102) vorgenommen. Zur quantitativen Bestimmung von Putrescin und Cadaverin wurden diese bei pH 3,2 in 0,05 m Acetatpuffer voneinander getrennt und durch leichtes Ansprühen mit einem verdünnten Ninhydrin-Reagenz sichtbar gemacht. Die ausgeschnittenen Banden und ein Papierblindwert wurden direkt mit dem Moor'schen Ninhydrin-Reagenz (71) in Butanol erhitzt. Mit Hilfe authentischer Präparate wurde auf dieselbe Weise eine Eichkurve für die kolorimetrische Messung aufgenommen.

Zu diesem Zweck wurden Gemische bestimmter Mengen Putrescin und Cadaverin (zwischen 20 und 200 γ) bei pH 3,2 elektrophoretisch getrennt. In jedem Falle diente das gewaschene Papier Nr. 2214 ff von der Firma Macherey und Nagel als Träger.

10. Allgemeine Methoden

Die präparative Ultrazentrifugationen wurden mit der Spinco-Zentrifuge Modell L und mit der präparativen Christ-Ultrazentrifuge durchgeführt. Für die Bestimmung der Sedi-

mentationskonstanten wurde die luftgetriebene analytische Phywe-Ultrazentrifuge verwendet.

Sämtliche Extinktionsmessungen wurden mit dem Spektrophotometer der Firma Beckman, Modell DU, durchgeführt.

Eine von H. Hölzel nach Angaben von Dr. W. Zillig nach dem Prinzip der feuchten Kammer konstruierte Hochspannungselektrophorese-Apparatur diente zur Durchführung der Papierelektrophoresen. Als Träger wurden Papiere von der Firma Macherey und Nagel verwendet. Für die Block-Elektrophorese erwies sich Sephadex G 75 als besonders gut geeignet.

Säulenchromatographische Trennungen von Proteinen wurden grundsätzlich bei 4° C vorgenommen. Die Cellulose-Ionenaustauscher wurden von der Firma Macherey und Nagel bezogen.

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry (103) durchgeführt. Zur Herstellung der Eichkurve diente getrocknetes Rinderserumalbumin (Behring).

Die RNS-Bestimmungen erfolgten entweder spektrophotometrisch oder nach der Orcin-Methode (104).

DNS wurde nach der Methode von Z. Dische (105) bestimmt.

Literaturverzeichnis

1) T.Caspersson, Naturwiss. 29, 33 (1941)

2) J.Brachet, Chemical Embryology (New York: Interscience Publishers,Inc.), (1950)

3) J.M.Denuce, Biochim.Biophys.Acta 8, 111 (1952)

4) S.Lesher, J.Exper.Cell Res. 2, 577 (1951)

5) H.Stich, Ztschr.Naturforsch. 6b, 319 (1951)

6) P.C.Caldwell, E.L.Mackor, C.Hinshelwood, J.Chem.Soc. 1950, S. 3151

7) R.Jeener, Arch.Biochem.Biophys. 43, 381 (1953)

8) A.Claude, Science 97, 451 (1943), sowie dort zitierte Arbeiten

9) K.R.Porter, J.Exptl.Med. 97, 727 (1953); G.E.Palade, in "Enzymes, Units of Biological Structure and Function", 1956, S. 200 ff.

10) G.E.Palade, P.Siekevitz, J.biophys.biochem.Cyt. 2, 171 (1956)

11) dieselben, ebenda, S. 671

12) H.K.Schachman, A.B.Pardee, R.J.Stanier, Arch.Biochem. Biophys. 38, 245 (1952)

13) H.Chantrenne, Ann.Rev.Biochem. 27, 35 (1958); J.L.Simkin, ebenda 28, 145 (1959); G.N.Cohen, F.Gros, ebenda 29, 525 (1960); P.Berg, ebenda 30, 293 (1961)

14) A.Korner, Biochim.Biophys.Acta 35, 554 (1959)

15) M.Rabinowitz, M.E.Olson, J.biol.Chem. 234, 2o85 (1959)

16) J.W.Littlefield, E.B.Keller, J.Gross, P.C.Zamecnik, J.biol.Chem. 217, 111 (1959)

17) D.Schachtschabel, W.Zillig, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 314, 262 (1959)

18) Symposion on Amino Acid Activation, Proc.nat.Acad.Sci. 44, 67-104 (1959)

19) H.G.Zachau, G.Acs, F.Lipman, Proc.nat.Acad.Sci. 45, 505 (1959)

20) M.B.Hoagland et al., Proc.nat.Acad.Sci. 46, 1554 (1960)

21) S.Brenner, F.Jacob, M.Meselson, Nature 190, 576 (1961)

22) E.Volkin, Fed.Proc. 21, Nr.1

23) M.Hayashi, S.Spiegelman, Proc.nat.Acad.Sci. 47, 1564 (1961)

24) S.Spiegelman et al., Proc.nat.Acad.Sci. 47, 1135 (1961)

25) M.Chamberlin, P.Berg; W.B.Wood, P.Berg, Proc.nat.Acad. Sci. 48, 81, 94 (1962)

26) F.Gros et al., Nature 190, 581 (1961); S.Brenner et al., s. unter 21)

27) D.Nathans, G.v.Ehrenstein, F.Lipman, Fed.Proc. 21, No.1, 127 (1962)

28) A.Goldstein, B.J.Brown, Biochim.Biophys.Acta 53, 438 (1961)

29) J.Bishop, J.Leahy, R.Schweet, Proc.nat.Acad.Sci. 46, 1030 (1960)

30) H.M.Dintzis, Proc.nat.Acad.Sci. 47, 247 (1961)

31) J.Mendelssohn, A.Tissières, Biochim.Biophys.Acta 35, 248 (1959)

32) R.J.Britten, R.B.Robberts, Science 131, 32 (1960)

33) A.Tissières, S.D.Watson, Nature 182, 778 (1958) dieselben, mit D.Schlesinger und B.R.Hollingworth, J.Mol.Biol. 1, 221 (1959)

34) W.Zillig, W.Krone, M.Albers, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 317, 132 (1959)

35) H.E.Huxley, G.Zubay, J.Mol.Biol. 2, 10 (1960)

36) H.Schuster, G.Schramm, W.Zillig, Z.Naturforsch. 11b, 339 (1956)

37) C.G.Kurland, J.Mol.Biol. 2, 83 (1960)

38) H.Boedtker, W.Möller, E.Klemperer, Nature 194, 444 (1962)

39) W.Zillig, unveröffentlicht

40) U.Z.Littauer, H.Eisenberg, Biochem.Biophys.Acta 32, 320 (1959)

41) H.K.Kihara et al., Fed.Proc. 20, 388 (1961)

42) M.Feldman, D.Elson, A.Globerson, Nature 185, 317 (1960)

43) P.O.P.Ts'o, in "Ribosomal Particles and Protein Biosynthesis", 1. Symp.Biophys.Soc. (1958) S. 156.

44) W.C.Gillchriest, R.M.Bock, ebenda, S. 1

45) C.F.Crampton, M.L.Petermann, J.biol.Chem. 234, 2642 (1959)

46) E.Fredericq, H.Neurath, J.Amer.chem.Soc. 72, 2684 (1950)

47) W.Zillig, W.Doerfler, unveröffentlicht

48) H.K.Kihara, H.Halvorson, R.Bock, Biochim.Biophys.Acta 49, 212 (1961)

49) N.W.Pirie, Biochem.J. 47, 614 (1950)

50) D.Elson, Biochim.Biophys.Acta 27, 216 (1958)

51) D.Elson, ebenda 36, 362, 372 (1959)

52) D.Elson, "Biologically active proteins, associated with ribosomes", in Harris, "Protein Biosynthesis" (1961), S. 291

53) P.F.Spahr, B.R.Hollingworth, J.biol.Chem. 236, 823 (1961)

54) W.Krone, W.Zillig, unveröffentlicht

55) D.M.Brown, D.J.Magrath, A.R.Todd, J.Chem.Soc. 1952, 2708

56) D.M.Brown, C.A.Decker, A.R.Todd, ebenda 1952, 2715

57) M.Smith, J.G.Moffath, H.G.Khorana, J.Amer.chem.Soc. 80, 6204 (1958)

58) D.Lipkin, W.H.Cook, R.Markham, J.Amer.chem.Soc. 81, 6198 (1959)

59) W.Ostrowski, A.Tsugita, Arch.Biochem.Biophys. 94, 68 (1961)

60) E.J.King, Biochem.J. 26, 292 (1932)

61) C.B.Anfinsen, Compt.rend.d.trav.du Lab.Carlsberg, Ser.Chim. 30, 13 (1956)

62) W.Zillig, D.Schachtschabel, W.Krone, Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 318, 100 (1960); sowie H.G.Zachau, et al. siehe Nr. 19

63) G.Pfleiderer, D.Jeckel, Th.Wieland, Arch.Biochem. Biophys. 83, 275 (1959)

64) H.Fraenkel-Conrat, B.Singer, A.Tsugita, Virology 14, 54 (1961)

65) G.Kaluitsky, J.P.Hummel, Ch.Dierks, J.biol.Chem. 234, 1512 (1959)

66) L.Vandendriessche, Arch.Biochem.Biophys. 65, 347 (1956)

67) M.R.McDonald, J.gen.Physiol. 32, 33 (1948)

68) C.Lamanna, M.F.Mallette, Arch.Biochem.Biophys. 24, 451 (1949)

69) C.B.Anfinsen et al., Biochim.Biophys.Acta 17, 141 (1955)

70) H.Michl, J.Chromatography 1, 93 (1958)

71) S.Moore, W.H.Stein, J.biol.Chem. 211, 907 (1954)

72) W.Krone, Diplom-Arbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, München 1960

73) P.Siekevitz, G.E.Palade, J.Biophys.Biochem.Cyt. 4, 309 (1958)

74) S.R.Dickman, K.M.Trupin, Biochim.Biophys.Acta 30, 200 (1958)

75) P.O.P.Ts'o, J.Bonner, J.Vinograd, Biochim.Biophys.Acta 30, 570 (1958)

76) G.Webster, J.B.Lingrel, in Harris "Protein Biosynthesis" (1961) Seite 301 ff.

77) Y.Tashiro, J.Biochem.Japan 45, 937 (1958)

78) Fu-Chuan Chao, Arch.Biochem.Biophys. 70, 426 (1957)

79) J.J.Stanesh, Doktorarbeit, Berkeley 1958, University of California

80) M.Petermann, M.Hamilton, in Harris "Protein Biosynthesis" (1961) Seite 233

81) D.Elson, ebenda, Seite 291

82) M.Tal, D.Elson, Biochim.Biophys.Acta 53, 227 (1961)

83) W.Zillig, W.Doerfler, unveröffentlicht

84) J.M.Eisenstadt, T.Kameyama, G.D.Novelli, Proc.nat.Acad. Sci. 48, 652 (1962)
und T.Kameyama, G.D.Novelli, ebenda Seite 659

85) K.McQuillen, in Harris "Protein Biosynthesis" (1961) Seite 263 ff.

86) T.Kameyama, G.D.Novelli, Bacteriol.Proc. 1960, 148

87) H.E.Wade, S.Lovett, Biochem.J. 81, 319 (1961)

88) G.A.Strasdine, L.A.Hogg, J.J.Campbell, Biochim.Biophys. Acta 55, 231 (1962)

89) C.J.Davern, M.Meselson, J.Mol.Biol. 2, 153 (1960)

90) P.O.P.Ts'o, J.Vinograd, Biochem.Biophys.Acta 49, 113 (1961)

91) B.Ames, D.T.Dubin, S.M.Rosenthal, Science 127, 814 (1958)

92) C.W. und H.Tabor, S.M.Rosenthal, unveröffentlicht

93) S.S.Cohen, J.Lichtenstein, J.biol.Chem. 235, 2112 (1960)

94) E.J.Herbst, B.P.Doctor, J.biol.Chem. 234, 1497 (1959)

95) W.Zillig, W.Doerfler, unveröffentlicht

96) W.Zillig, H.Hölzel, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 312, 140 (1958)

97) R.Monier, M.L.Stephenson, P.C.Zamecnik, Biochim.Biophys.Acta 43, 1 (1960)

98) K.S.Kirby, Biochem.J. 64, 405 (1956)

99) G.R.Wyatt, Biochem.J. 48, 584 (1951)

100) D.C.Carpenter, Anal.Chem. 24, 1203 (1952)

101) H.T.Gordon, W.Thornburg, L.N.Werum, Anal.Chem. 28, 849 (1956)

102) F.Sanger, Biochem.J. 39, 507 (1945)

103) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall, J. biol.Chem. 193, 265 (1951)

104) Z.Dische, K.Schwarz, Mikrochim.Acta 2, 13 (1937)+)
105) F.B.Seibert, J.biol.Chem. 133, 593 (1940)+)

+) Analysenvorschriften zu beiden Methoden befinden sich in: Chargaff-Davidson, The Nucleic Acids, Bd. I, Seite 285 ff.

Lebenslauf

Als Sohn des Apothekers Gerhard Krone und seiner Frau Agnes, geb. Fittbogen, wurde ich am 26.März 1932 in Sondershausen in Thüringen geboren. Dort kam ich 1938 in die Grundschule und besuchte von 1942 an die Geschwister-Scholl-Oberschule. Im Juni 1950 legte ich die Reifeprüfung ab.

Das Chemiestudium begann ich im Sommersemester 1951 in Tübingen. Seit dem Sommersemester 1954 übernahm die Studienstiftung die Finanzierung meines Studiums. Nach der mündlichen Diplomprüfung, die ich im Januar 1958 ablegte, trat ich als Diplomand in das Max-Planck-Institut für Biochemie in München ein.

Nach Abschluß der Diplomarbeit begann ich im Frühjahr 1960 mit den Experimenten zur Dissertation.